Université de Strasbourg — Faculté de Pharmacie

Année 1935-1936 № 150

Etude électrométrique des protéines de la farine

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le .....Juillet 1936
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

par

Mademoiselle Yvonne MATTHIS
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse:

MM. CH. LAPP, Professeur, Président
A. SARTORY, Professeur } Juges
Y. VOLMAR, Professeur }

STRASBOURG
Imprimerie Ch. & J. Goeller, 6c, Place d'Austerlitz
1936

Université de Strasbourg — Faculté de Pharmacie

Année 1935-1936 № 150

Etude électrométrique des protéines de la farine

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le .....Juillet 1936
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)
par

Mademoiselle Yvonne MATTHIS
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse:

MM. CH. LAPP, Professeur, Président
A. SARTORY, Professeur
Y. VOLMAR, Professeur } Juges

STRASBOURG
Imprimerie Ch. & J. Goeller, 6c, Place d'Austerlitz
1936

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

Administration

MM. A. SARTORY, *Doyen*, C. ✻, I. ✿, C. ✿
Y. VOLMAR, *Assesseur*
CUVIER, *Secrétaire*, A. ✿

Doyen honoraire

M. JADIN, O. ✻, I. ✿, ✿

Professeurs

MM.	A. SARTORY, C. ✻, I. ✿, C. ✿	Bactériologie.
	LAVIALLE, I. ✿, ✿	Botanique.
	VOLMAR, I. ✿	Chimie organique.
	N.	Matière médicale.
	GUILLAUME, ✻, ✖, I. ✿, ✿	Pharmacie galénique.
	LAPP ✿ I.	Chimie analytique.
	N. (CORDIER, chargé de cours)	Pharmacie chimique.

Professeur honoraire

M. JADIN, O. ✻, I. ✿, ✿

Chargé des fonctions d'agrégé

M. R. SARTORY ✿

Cours complémentaires

MM.	A. SARTORY	Hygiène.
	LAVIALLE	Hydrologie.
	VOLMAR	Chimie minérale.
	N.	Toxicologie.
	GUILLAUME	Zoologie.
	LAPP	Physique.
	EISENMANN	Législation et Déontologie.
	CORDIER	Chimie biologique.
	R. SARTORY	Cryptogamie.

Chefs de travaux pratiques

MM.	R. SARTORY	Bactériologie et Parasitologie.
	COLLARD, I. ✿, ✖	Chimie pharmaceutique.
	BOHN, A. ✿	Histoire naturelle.
	DUQUENOIS	Chimie et Physique.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A Mon Président de Thèse

Monsieur le Professeur Ch. LAPP

Professeur de Chimie Analytique

Hommage de respectueuse reconnaissance.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548005_0003

A mes Juges

Monsieur le Doyen SARTORY

Monsieur le Professeur VOLMAR

Hommage de profonde gratitude.

A la mémoire de

Monsieur le Doyen LOBSTEIN

A la mémoire de MA MERE

A MON PERE

En témoignage de ma vive reconnaissance et de ma filiale affection.

A MES FRERES

A MES PARENTS ET AMIS

AVANT-PROPOS.

La fabrication du pain repose sur deux opérations distinctes: la mouture du blé et la panification de la farine. Deux industries réalisent ces opérations: la meunerie et la boulangerie, qui diffèrent totalement dans leur technique et dans leur but. Le meunier moderne ne peut cependant se passer de l'avis du boulanger et dans les grandes entreprises de meunerie il y a des installations de boulangerie ainsi que des laboratoires de chimie et d'essais des divers blés et farines.

C'est un fait connu que la valeur boulangère d'un blé dépend de la qualité et de l'abondance du gluten. Les farines destinées à la panification doivent contenir une proportion de gluten bien définie (9-10% *d'après* Fleurent (14). *C'est pour ces farines que pourra alors intervenir comme point de comparaison, le facteur «élasticité». Or, l'élasticité d'un gluten dépend de la teneur respective du gluten en gliadine et gluténine.*

On améliore la quantité *de gluten d'une farine en mélangeant les blés indigènes avec des blés étrangers très riches en gluten. Quant au rapport optimum gliadine/gluténine dans le gluten, il est plus difficile de résoudre ce problème. On ne sait pas encore produire à volonté un blé riche en gliadine ou en gluténine. Ce rapport d'ailleurs n'est pas défini nettement. Les résultats donnés par* Fleurent *sont contestés de nos jours.*

Pour mesurer l'élasticité d'un gluten, l'industrie emploie divers types d'appareils appelés extensimètres (Chopin etc.).

Des études systématiques sont en cours pour les différents constituants de la farine. On s'est occupé du stock glucidique et des lipides. Récemment des études ont été faites sur la fermentation panaire (Schell et Guillemet).

Quant aux protéines de la farine on se borne jusqu'à présent à définir le taux en azote. On en tire le taux en protéines en multipliant le chiffre d'azote par une constante arbitraire qui diffère d'un pays à l'autre (5,7 *pour les américains et* 6,25 *pour les européens*).

Dans l'étude chimique des protéines de la farine, il reste donc beaucoup à faire. La question du pH étant à l'ordre du jour, nous avons essayé de mettre au point une méthode permettant de déterminer les points isoélectriques. Cette méthode physico-chimique permettrait de différencier les diverses protéines à l'aide des points isoélectriques. Connaissant qualitativement ces protéines, on pourra peut-être même les définir quantitativement, et en déduire le rapport optimum gliadine/

gluténine nécessaire à la production d'une bonne farine. Le but de notre travail est d'élucider le premier point: quels sont les points isoélectriques apparents des protéines de la farine de blé.

Avant d'entrer dans le vif du sujet, nous adressons ici à notre cher maître, Monsieur le Professeur Lapp, *nos plus vifs remerciements pour l'accueil bienveillant qu'il nous a réservé dans son laboratoire, pour les encouragements et les conseils éclairés qu'il n'a cessé de nous prodiguer pendant nos recherches.*

Nos sentiments de chaude reconnaissance vont à Monsieur le Doyen Sartory *et à Monsieur* Volmar *pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de faire partie du jury de notre thèse, et pour le précieux enseignement qu'ils nous ont transmis.*

Nous remercions également la Direction des Grands Moulins *de Strasbourg, d'avoir mis à notre disposition les divers échantillons de farine, et de nous avoir permis de puiser dans leur riche bibliographie.*

Nous n'aurions garde d'oublier Monsieur Schell, *Directeur du* Laboratoire Central *de chimie des Grands Moulins de Strasbourg, qui nous a accueilli avec tant d'amabilité dans son laboratoire pour nous initier aux dosages d'azote les plus modernes et qui a suivi nos recherches avec beaucoup d'intérêt.*

Que la Société des Amis de l'Université de Strasbourg trouve ici l'expression de notre profonde gratitude pour l'aide qu'elle a bien voulu nous apporter.

C'est avec regret que nous quittons la faculté de pharmacie, et surtout le laboratoire, où, entourée de l'amitié de nos chers camarades, nous avons vécu des heures inoubliables.

Que tous ceux qui par leurs conseils nous ont aidé et facilité nos recherches trouvent ici l'expression de notre grande reconnaissance.

INTRODUCTION

COMPOSITION CHIMIQUE GENERALE DU GRAIN DE BLE.

Dès le début de la chimie de nombreux savants s'occupèrent de la composition chimique du grain de céréales. C'étaient des savants américains, français, anglais etc. dont les plus illustres sont Jago, Osborne, Fleurent, Vauquelin, Boussingault, Mouniès etc. Aux premières données élémentaires (eau, matières minérales, cendres etc.) ont succédé les renseignements sur l'azote, puis sur les lipides. Des recherches récentes ont eu pour but d'isoler les divers constituants des grands groupes principaux (lipides, protides, glucides etc.). On a essayé de connaître leur structure. On s'est également intéressé aux ferments, aux actions diastasiques etc. Malheureusement on ne peut considérer comme définitivement établies, que les données les plus anciennes; de longs travaux seront encore nécessaires pour élucider les questions des lipides, des protides etc.

Enumérons rapidement les constituants connus:

1° Eau.

On dose le degré d'humidité de la farine. La moyenne de ce taux d'humidité est à peu près de 13-14% (König). L'hygroscopie joue un grand rôle dans la conservation des grains. Dans l'industrie il existe des appareils spéciaux pour doser le degré d'humidité.

2° Eléments chimiques.

On trouve dans le grain de blé un grand nombre d'éléments chimiques; ce sont: C, H, O, N, S, P, Si, Cl, Br, I, K, Na, Ca, Mg, Fe, Al, Mn, Cu, Zn, etc. Certains de ces éléments sont à l'état de combinaisons inorganiques. La plupart d'entre eux entrent dans des combinaisons organiques complexes. Leurs liaisons et leur rôle sont encore assez mal connus.

3° Matières minérales.

Leur dosage se fait sur les cendres. Le taux est en moyenne de 1,77%. Ces cendres sont surtout composées de phosphate de potasse et de magnésie. Il s'y ajoute une proportion variable de silice provenant des enveloppes.

4° Lipides.

Les grains de blé broyés, en contact avec un solvant approprié, abandonnent les matières grasses. Le solvant évaporé, il reste une matière oléagineuse insoluble dans l'eau. Ces lipides sont extraites par les méthodes de Kumagawa ou de Soxhlet,

Les matières grasses se forment et s'accumulent dans le grain de blé, mais beaucoup moins que les matières azotiques et surtout l'amidon.

5° Glucides.

La majeure partie du grain de blé est constituée par les hydrates de carbone ou glucides. En effet, dans le blé on en trouve de 60 à 70%. Ces matières non azotées sont inégalement réparties dans le grain. Elles abondent dans l'amande sous forme d'amidon, dans l'enveloppe sous forme de cellulose; elles manquent dans le germe, riche en protides et en lipides.

6° Protides.

Dès 1833, Gay-Lussac avait signalé la présence de l'azote dans toutes les graines, «ce qui explique leur valeur nutritive». De 1840-1842, Dumas d'une part, Liebig de l'autre, séparèrent les matières organiques azotées des non azotées.

La proportion d'azote total des diverses céréales les classe dans le même ordre que leurs qualités boulangères et leur taux en gluten, c'est-à-dire le blé en tête et le riz en queue. C'est pourquoi les généticiens d'Amérique se sont surtout occupés du taux d'azote. En France, Mlle Péraud, en 1933, a classé les variétés de blé d'après leur teneur en gluten. En ces dernières années, on a choisi comme semence des variétés à fort rendement pondéral, mais à faible teneur en azote et en gluten, ce qui rend la panification moins aisée, si l'on n'a soin d'ajouter des *blés de force* étrangers. D'ailleurs, une même variété de blé selon les conditions climatériques, l'humidité du sol etc. peut donner un taux en azote assez différent.

Les engrais ajoutés au sol ont également leur importance. Bailey a montré que des engrais azotés augmentent la teneur en azote du blé.

Le rôle des matières protéiques dans la panification de la farine est donc essentiel. Le gluten du blé, comme on sait, a des caractères spéciaux. Ce sont ses qualités qui permettent la panification. Son absence dans les autres céréales explique que les valeurs boulangères de ces céréales soient nulles. (Ex. riz, avoine, orge, etc.).

Dès le début des études sur la farine on a essayé d'étudier les protides en les isolant dans le *pâton de gluten*. On a considéré la quantité respective de gliadine et de glutéline dans le pâton de gluten et on en a déduit qu'il existait un équilibre gliadine-glutéline dont nous reparlerons plus loin.

Les deux qualités essentielles du gluten sont son élasticité et sa faculté de se gonfler facilement. Des appareils spéciaux appelés extensimètres permettent de mesurer l'élasticité du gluten. Un autre point important de la panification est la question du pH. Une bonne panification n'est possible que si le pH de la pâte a une valeur déterminée située aux environs de pH 5. Les protides, dans une étude de farine vont occuper une grande place et de nombreux savants cherchent à éclaircir les notions encore un peu vagues jusqu'à présent.

On sait que pour les protides le point isoélectrique est une de leurs caractéristiques les plus importantes et permet de les définir. Comme chaque protéine a son point isoélectrique bien défini, cela pourra permettre de distinguer diverses protéines surtout dans la farine, dont l'étude par

les moyens chimiques n'a pu donner jusqu'à présent de grandes indications.

Nous avons essayé de mettre au point une méthode permettant une mesure électrométrique de pH des diverses protéines de la farine.

NOTIONS GENERALES CONNUES.

Les protides réunissent un groupe de substances plus hétérogènes que les lipides. Leur caractère commun est la présence dans leur molécule, d'azote associé au carbone, à l'oxygène et à l'hydrogène, quelquefois au soufre et au phosphore, plus rarement au fer et au cuivre. Leur poids moléculaire est très élevé et leur structure chimique très complexe. Leur aspect physique est variable. Certains peuvent être élastiques comme le gluten, d'autres cornés comme l'aleurone. En général ils sont coagulés par la chaleur et hydrolysés par les acides.

Il a fallu du temps et beaucoup de patience pour dégager une notion nette sur les protéines. Aux analyses élémentaires de l'azote total se sont ajoutés les dosages d'azote ammoniacal, d'azote non protéique etc. Des tentatives de synthèse ont abouti aux conceptions actuelles qui sont encore loin d'être satisfaisantes.

En 1745, Beccari, le premier, imagina de séparer de la farine le glutineux sous un filet d'eau.

En 1805, Einhof proposa d'extraire ce gluten par l'alcool.

En 1820, Taddei montra que l'alcool n'extrayait pas tout le gluten.

D'autres travaux suivirent et c'est à Osborne qu'on doit la majeure partie des découvertes. (28).

On divise lès protides en deux groupes.

1° les protides simples;
2° les protides conjugués.

PROTIDES SIMPLES.

Ils sont séparés de la manière suivante:

solubles dans l'eau: albumines

insolubles dans l'eau { insolubles dans l'alcool { sol. NaCl: globulines; insol. NaCL: glutélines
insolubles dans l'eau { solubles dans l'alcool { prolamines.

Dans le blé nous retrouverons les différentes protéines.

Albumine.

Elle fut isolée par Osborne (29. 30) en 1907 dans le blé; on l'appela leucosine; elle fut retrouvée dans le seigle et l'orge à un taux comparable et identifiée avec la leucosine du blé.

En 1923 Jones et Gersdorff ont retrouvé cette leucosine dans le son.

Constitution:

53% C
6,8% H
16,8% N
1,3% S
22,1% O

Caractères:

Cette albumine présente toutes les qualités des corps albuminoïdes en général. Elle coagule par la chaleur à la température de 52°. Elle forme à peu près 3-4 p/1000 du poids de l'amande; elle est plus abondante dans le germe (10% environ). Elle est soluble dans l'eau. On la sépare de la globuline par dialyse; les globulines précipitent. La leucosine est soluble dans les solutions salines neutres, mais précipite dans les solutions saturées. A ce point de vue elle ressemble aux albumines d'origine végétale, mais diffère des albumines animales. Elle est insoluble dans l'alcool. Par hydrolyse, la leucosine donne des acides aminés nombreux dont les principaux sont la leucine (11,3%), l'acide glutamique (6,73%), l'arginine (5,94%). L'albumine se dissolvant dans l'eau ne se retrouvera pas dans le pâton de gluten.

Globuline.

Elle fut isolée par Osborne dans le blé en 1907. La globuline est analogue à l'albumine par sa constitution. D'ailleurs elle se trouve à côté de cette dernière dans les plantes. Cette globuline existe également dans l'orge et le seigle à un taux comparable. Jusqu'à présent on considère la globuline comme identique dans les 3 sortes de céréales, mais rien n'a pu être prouvé.

Constitution:

51,3% C
6,85% H
18,39% N
0,69% S
23,04% O

Caractères:

La globuline coagule par la chaleur vers 87°. Elle est insoluble dans l'eau pure, ce qui la différencie de l'albumine. Elle est soluble dans les solutions alcalines et dans les solutions contenant de 5-10% NaCl. Elle dialyse facilement.

Elle se trouve à un taux de 6 p/1000 dans l'amande et de 5% dans le germe. — La globuline s'extrait avec une solution de NaCl à 10%.

Glutéline.

Les glutélines ont reçu le nom de gluténine dans le blé et d'oryzénine dans le riz. Celle du blé a été la plus étudiée. Ritthausen avait analysé cette protéine et l'avait dénommée glutencaséine.

Constitution:

52,34% C
6,83% H
17,49% N
1,08% S
22,26% O

Caractères:

La gluténine est insoluble dans l'eau pure et dans les solutions salines neutres; elle est également insoluble dans l'alcool. Elle se trouve à un taux de 4,68% dans l'amande, mais elle manque dans l'embryon.

La gluténine constitue avec la gliadine la totalité du gluten du blé. On ne la retrouve dans aucune autre céréale.

La gluténine est obtenue à partir du gluten. Du pâton de farine (malaxée sous l'eau pour enlever l'amidon) on enlève la gliadine en traitant à diverses reprises par de l'alcool. Le résidu est séché et digéré avec l'éther et l'alcool, puis solubilisé dans NaOH ou KOH diluées. On peut à nouveau traiter par un acide qui précipite la gluténine. Après une nouvelle digestion dans l'éther et l'alcool on obtient, assez difficilement, la gluténine sous forme de poudre blanche. Par hydrolyse la gluténine donne des acides aminés dont les principaux sont la lysine (2%), l'arginine (4,54%), l'acide glutamique (9%), la tyrosine (2,75%).

Certains auteurs comme NEUMANN (25) se demandent s'il n'y a pas idendité entre la gluténine et la gliadine, et si l'une des molécules n'est pas un peu plus complexe que l'autre. Cette théorie de NEUMANN semble être justifiée si on considère les données et études récentes des protéines, dont nous reparlerons dans un autre chapitre.

Prolamines.

La prolamine contenue dans le blé a été nommée gliadine.

Constitution:

52,72% C
6,86% H
17,66% N
1,03% S
21,73% O

Caractères:

La gliadine est soluble dans l'alcool à 70°, insoluble par contre dans l'alcool absolu et pratique-

ment insoluble dans l'eau pure. Elle est soluble dans les solutions diluées d'acides et de bases. L'amande en contient 96% et l'embryon n'en contient pas.

Les opinions des savants sur la structure de la gliadine sont fort variables. Ainsi Ritthausen prétend que cette protéine est constituée par plusieurs substances semblables telles que gliadine, glutenfibrine et mucédine, substances qui se distinguent par leur solubilité dans l'alcool à différentes concentrations. D'autres savants parmi lesquels Osborne, O'Brien, Morishama, considèrent la gliadine comme un corps simple soluble dans l'alcool.

On obtient la gliadine à partir du gluten, qu'on traite à diverses reprises par de l'alcool à 70°. Les solutions alcooliques sont concentrées dans le vide, puis la solution concentrée est versée dans un grand volume d'eau froide. On purifie en faisant digérer avec l'éther.

Par hydrolyse on obtient des acides aminés tels que la proline, la phénylalanine, l'acide glutamique etc. Kutscher a démontré que les produits d'hydrolyse de la gliadine et de la gluténine différaient légèrement; en effet la gliadine ne donne pas de lysine et beaucoup d'acide glutamique, tandis que la gluténine donne de la lysine et peu d'acide glutamique. La gliadine est la plus stable de toutes les protéines du blé.

MM. Javillier et Djelatidès (18) dans leurs travaux récents sur la farine du blé pensent avoir pu isoler une autre protéine soluble seulement dans l'alcool potassé. La structure et la composition chimique de cette protéine ne sont pas encore connues.

Toutes ces protéines ont un poids moléculaire très élevé. Pour la gliadine il est au moins de 15 560, mais peut être de l'ordre de 125 000. Celui de la gluténine est au moins de 36 360 mais peut être de 108 900.

Par hydrolyse les protides donnent à peu près tous les acides aminés connus.

Tout l'azote des céréales n'est pas engagé dans les protides. Il en est aussi un peu dans des pigments tels que la chlorophylle, dans des lipides tels que les aminolipides (lécithine), dans les composés sucrés etc. On a également signalé quelques bases azotés comme l'hordéine, l'oryzanine (de la pellicule du riz), laquelle est peut-être la vitamine B qu'on rencontre également abondante dans le grain de blé.

Ces notions sommaires n'ont pas encore trouvé d'application. On sait depuis longtemps que la *force* des farines, c'est-à-dire leur qualité de se gonfler sans rompre, pendant la fermentation panaire, est directement liée à leur richesse en azote et à leur teneur en gluten. Et comme on sait aussi depuis Beccari isoler facilement le gluten et l'amidon, les efforts de détermination ont uniquement porté sur le gluten.

Si on considère leur qualité colloïdale, la gliadine et la gluténine diffèrent; la gliadine se gonfle facilement dans l'eau en donnant une masse semi-fluide et élastique; la gluténine ne se gonfle pratiquement pas et s'obtient en petits grains après l'extraction de la gliadine. Pendant l'extraction de la gliadine le gluten perd de son élasticité pour se désagréger lentement. On a donc eu l'idée de rapprocher la qualité du gluten de la teneur respective en gliadine et gluténine.

Fleurent est l'un des premiers à étudier le rapport gliadine-gluténine. Il distingue trois types de gluten:

gluten très élastique (rapport fixe optima)
gluten moyen (prédominance de gluténine)
gluten faible, peu élastique (prédominance de gliadine).

Après l'analyse Fleurent en effet constate les rapports suivants:

1er cas:	gluténine	25%,	gliadine	75%.
2e cas:	»	34%,	»	66%.
3e cas:	»	20%,	»	80%.

Peu à peu, après d'autres analyses, les résultats de Fleurent furent très discutés. D'autres auteurs comme Osborne, Blish, Sharp, etc. trouvèrent des résultats différents (rapport 50%).

Des expériences récentes de Kosmin et Popzowa (23) semblent prouver que la bonne panification ne dépend pas du rapport quantitatif gliadine-gluténine, mais plutôt d'autres facteurs influençant ce complexe protéique. Comme ces données ne sont pas officiellement admises nous pourrons toujours faire dépendre la bonne panification du pain, du rapport gliadine-gluténine.

PROTIDES CONJUGUES.

Ces corps complexes se scindent facilement en un protide simple et un autre groupe, qui peut être un complexe phosphoré: la nucléine, ou un complexe hydrocarboné ou un pigment. On les connaît encore moins que les protides simples. Osborne et Harris ont trouvé dans le germe de blé une assez grande quantité d'acide triticonucléique, donnant

par décomposition de la guanine, de l'adénine et un pentose. Il a été retrouvé par Leven, et La Forge (1910), Thomas et Derx (1925). Il semble que les protides conjugués soient les matières azotées essentielles du noyau, les protides simples étant celles du cytoplasme. Mais la complexité et la fragilité de ces corps sont telles qu'on est loin encore de connaître tous les détails de leur constitution et leur transformation dans l'organisme.

Constitution chimique des protides.

En général les substances protéiques, chimiquement nous apparaissent comme formées par l'association de divers acides aminés, répondant au schéma général suivant: NH -R-COOH.

Quant à la structure exacte de ces molécules les auteurs admettent diverses théories. On peut par exemple considérer que les acides aminés sont joints entre eux pour former des chaînes de polypeptides de la forme suivante:

NH - R - CO = NH - R' - COOH. (théorie de Fischer).

D'autre part on peut supposer l'existence dans les protides, de noyaux dicéto-pipéraziques, formés par deux acides aminés réunis par les deux bouts pour former une chaîne fermée.

A l'heure présente on est en droit de supposer qu'une micelle ou molécule protéidique comporte un squelette défini, qui fixe la nature du protéide, noyau susceptible de s'associer des constituants accessoires variés. Si on imagine isolée dans l'espace la molécule d'un protéide, le squelette serait une association relativement stable de chaînons parallèles, p. ex. une longue chaîne repliée plusieur fois. et pouvant même être fermée sur elle-même (7).

Les constituants latéraux associés au squelette forment les éléments variables d'un protéide quelconque. A côté de processus ordinaires de substitution et d'addition il peut intervenir des actions diverses, dans leur liaison au squelette.

Dans le cas particulier de la gliadine et de la gluténine il serait fort possible que le noyau soit identique aux deux et qu'il n'y ait que les liaisons peptidiques qui diffèrent.

La mesure de pH pourra d'ailleurs nous donner des indications et des éclaircissements sur cette question.

Quoiqu'il en soit on peut finalement supposer que la structure de la molécule protéique ressemble au schéma d'un gros acide aminé NH - R - COOH, R ayant des dimensions moléculaires considérables.

Les protéines ont les propriétés des colloïdes électrolytiques, mais possèdent en plus les caractères des corps ampholytes, c'est-à-dire des corps se comportant à la fois comme acides et comme bases. Le schéma général des ampholytes sera H - R - OH, la molécule étant capable de libérer H ou OH suivant qu'on se trouvera en milieu acide ou alcalin.

Exemple: dans un milieu de faible pH l'ampholyte se comportera comme une base libre et pourra être salifié par un acide. Au contraire dans un milieu de pH élevé l'ampholyte se comportera comme un acide libre et avec une base pourra donner un sel. Il arrive un moment où les deux valences sont également dissociées, à ce moment l'ampholyte est électriquement neutre. Dans l'électrolyse de l'ampholyte, si nous faisons passer un courant con-

tinu, le radical se transportera en milieu acide au pôle négatif et en milieu alcalin au pôle positif.

Au moment où les deux valences s'équilibrent le radical reste indifférent et on a un point de transport nul. Ce point est le point isoélectrique et est caractérisé par le pH du milieu. Il est spécifique de chaque ampholyte et coïncide en général avec un minimum de solubilité du corps; d'autres propriétés physiques telles que le pouvoir rotatoire, la pression osmotique etc. passent par des minima ou maxima relatifs ou absolus.

Le point isoélectrique est une caractéristique très importante des protéines; aussi avons-nous eu l'idée de nous baser sur ce point-là pour faire l'étude physico-chimique des protéines de la farine. Cette méthode une fois mise au point est beaucoup moins longue qu'une méthode purement chimique.

Nous divisons notre travail en quatre parties.

I. Méthode de dosage de N total.

II. Mesure des points isoélectriques.

III. Extraction des principales protéines.

IV. Analyse des courbes obtenues et comparaison avec les résultats donnés par d'autres auteurs

Conclusions.

CHAPITRE I.

METHODES DE DOSAGE DE N TOTAL.

PRINCIPE:

Ces méthodes ont pour principe commun la transformation des matières organiques azotées en eau, ammoniaque, et CO^2, sous l'influence à la fois oxydante et hydrogénante de l'acide sulfurique au voisinage de son point d'ébullition. Tout se passe comme si on avait:

$$2\ N + 3\ C + 3\ SO^4H^2 = 2\ NH^3 + 3\ CO^2 + 3\ SO^2$$

Ce dosage de N total a été particulièrement étudié par Kjehldahl (13). La méthode primitive consistait à chauffer la matière azotée avec SO^4H^2 concentré et, après dissolution, à ajouter au liquide du MnO^4K sec; le mélange d'abord brun foncé s'éclaircit et devient incolore. Depuis on a essayé un certain nombre de substances dites adjuvantes pour remplacer le MnO^4K; les unes sont oxydantes, les autres réductrices, d'autres élèvent le point d'ébullition de l'acide. En principe les adjuvants oxydants amènent une décoloration plus rapide

du mélange, mais on a vu que par addition de Cl^2O^4K on perdait jusqu'au tiers de l'azote à doser. La décoloration était produite par le départ, sous forme de CO^2 et H^2O, des produits carbonés. Rien n'indique donc la fin de la réaction. Les adjuvants réducteurs (Hg et oxalates) semblent préférables.

L'attaque de la substance azotée étant terminée il reste à doser l'azote ammoniacal. Pour cela on peut employer la méthode par distillation en présence d'un excès d'alcali avec les appareils de Schlœsing, Delattre, Aubin et titrage alcalimétrique de NH^3 libéré. Cette méthode est applicable avec tous les adjuvants.

1° DOSAGE DES PROTEINES DE LA FARINE:

Ce dosage revient à un dosage de l'azote total. Les résultats en azote sont très précis, mais le coefficient employé pour avoir la teneur en protéines est un peu incertain. D'ailleurs, les auteurs français et américains ne sont pas d'accord à ce point de vue. Le rapport des matières azotées à l'azote total varie entre 5,44 (globuline) et 5,95 (leucosine), ce qui justifie le coefficient 5,7 choisi par les Américains plutôt que le coefficient 6,25 habituellement admis en Europe.

Dans nos dosages nous utilisons toujours le coefficient 5,7, et nous employons une méthode plus récente différant un peu de la méthode classique, mais présentant sur elle de gros avantages. Cette méthode revient à un semi-microdosage et est due à MM. Schell et Guillemet. (37).

2° TECHNIQUE DU DOSAGE.

Principe:

1) On détruit la matière organique par SO^4H^2 concentré en présence de PO^4H^3 et d'un mélange catalyseur. L'azote donne du sulfate d'ammoniaque.

2) On libère NH^3 par NaOH dans l'appareil Parnas et Wagner modifié, et on l'entraîne par un courant de vapeur d'eau dans ClH titré.

3) De la quantité de ClH disparu on déduit la quantité de NH^3 et par suite celle de N. Cette méthode permet d'opérer sur un poids relativement petit (70-80 mg) de farine, ce qui présente un grand avantage de rapidité sur les autres méthodes.

3° DESCRIPTION DE LA METHODE.

1) *Pesée de la substance.*

En différents endroits de la farine à étudier, on prélève des échantillons dont on pèse 70 à 80 mg de farine bien homogène et on l'introduit dans le matras de Kjehldahl. On aura soin de faire toujour 3 ou 4 analyses de la même farine.

2) *Attaque de la substance et destruction de la matière organique.*

Dans le matras de Kjehldahl on introduit environ 0,70 g d'un mélange catalyseur, composé de SO^4K^2, SO^4Cu et HgO rouge dans le rapport 10:1:1. Ces 3 corps sont finement triturés et tamisés. On ajoute 4 cc SO^4H^2 concentré et 10 gouttes de PO^4H^3 cristallisé, saturé à froid qui hâte la destruction organique. Ce mélange catalyseur a été

spécialement étudié par MM. Schell et Guillemet, au laboratoire central de chimie des Grands Moulins de Strasbourg.

On chauffe le tout pendant 45 minutes dans le matras, en ayant soin de surveiller constamment l'ébullition. La substance noire au début s'éclaircit et devient bleu très clair. C'est à ce moment-là que la destruction organique est terminée. On laisse refroidir le liquide et on transvase dans l'appareil de Parnas et Wagner modifié. M. Schell a eu soin d'entourer le matras avec une enveloppe de verre qui maintient le vide autour du matras; cette enveloppe évite de chauffer le matras.

Le liquide transvasé du matras de Kjeldahl dans l'appareil, on rince 5 à 6 fois avec de l'eau distillée. On introduit 20 cc de lessive de soude à 50% additionnée d'hyposulfite de Na (100 g par litre). L'hyposulfite est ajoutée pour éliminer le mercure. On bouche l'orifice et on entraîne NH^3 par de la vapeur d'eau formée dans un ballon rempli d'eau distillée qu'on chauffe fortement. NH^3 est entraîné et recueilli dans 10 cc de ClHN/100. On distille pendant 7 à 8 minutes, en ayant soin de régler le courant de la vapeur d'eau. Le volume du distillat ne doit pas dépasser 8 à 10 cc.

4° TITRAGE.

Après ces 9 minutes on enlève le bécher contenant ClH N/100 et on dose l'excès de NH^3 dans cette solution par NaOH N/100. Au préalable on chauffe le bécher afin de chasser CO^2 qui fausserait les résultats. Comme indicateur coloré on se sert du rouge

de méthyle (acide paradiméthylazobenzèneorthocarbonique) en solution de 0,02 gr. dans 100 cc d'alcool à 90°.

1 cc ClH N/100 = 1 cc NaOH N/100 = 0,00014 N.

Une fois la quantité de N déterminé on multiplie par 5,7 pour avoir la teneur en protéines. Avant de faire le dosage d'azote total on fait un dosage à blanc avec toutes les substances utilisées, pour vérifier la pureté des réactifs. Cette méthode très rapide permet de faire une grande quantité de dosages dans une journée. D'après les méthodes classiques une destruction organique à elle seule demande quelquefois 2-3 heures. Nous avons opéré sur différentes farines (manitoba, farine ordinaire 00 etc.).

Le pourcentage en protéines varie de 1,5% à 1,98%.

CHAPITRE II.

MESURE DES POINTS ISOELECTRIQUES.

1° METHODE DE MESURE DU pH.

Pour la mesure électrométrique du pH nous avons opéré avec l'électrode d'antimoine et le potentiomètre de Chauvin et Arnoux.

La détermination du pH d'une solution, à l'aide d'électrodes d'antimoine a été étudiée dans la pratique par différents auteurs (Guéron (7), Vlès (42) et Gex (16) etc.) et a donné d'excellents résultats. Elle est surtout utilisée dans les titrages potentiométriques.

D'ailleurs la manipulation de l'électrode à hydrogène est très délicate et son fonctionnement souvent gêné par les empoisonnements de toutes sortes. Dans notre cas surtout les protéines donnent à l'électrode un fonctionnement aberrant.

Il est naturel que l'électrode à hydrogène reste l'électrode de référence pour l'étalonnage de l'électrode d'antimoine. Une fois étalonnée cette électrode permet des mesures en série très exactes en général.

$$pH = AE + C \qquad \text{si } C > 1$$

pH est le pH mesuré, correspondant à E millivolts.

C est le pH d'une solution de référence. C'est une constante, indépendante des électrodes employées. A est un paramètre qui théoriquement devrait être le même pour toutes les électrodes d'antimoine, mais qui en pratique, varie avec les différents échantillons. A se détermine facilement par un étalonnage.

Le dispositif comprend 2 piles montées en série avec opposition des pôles de même signe. L'ensemble a une force électromotrice qui est la différence des forces électromotrices des 2 piles.

Chacune des 2 piles est constituée par un élément au calomel et par un élément réalisé avec une solution électrolytique dans laquelle plonge l'électrode d'antimoine. Les 2 éléments au calomel sont identiques. Les 2 solutions électrolytiques sont:

1° l'une une solution de ClH N/10 de pH connu: 1,08.

C'est la solution de référence.

2° l'autre la solution de pH inconnu.

Les électrodes d'antimoine sont les deux moitiés d'une baguette d'antimoine bien homogène, reliées par un fil de cuivre. Il va de soi que la chaîne doit être toute entière à la même température.

Les 2 piles sont réunies par les fils de laiton des électrodes d'antimoine.

L'électrode de platine de la pile contenant ClH N/10 (pH le plus bas) est reliée à la borne — du potentiomètre. Le platine de l'autre pile est relié à la borne +.

Dans ces conditions on a

$$AE = pH - C$$

La force électromotrice de la chaîne correspond à un pH qui est la différence des forces électromotrices des deux solutions électrolytiques pH et C.

2° TECHNIQUE DE LA MESURE DU pH.

Avant d'utiliser les électrodes d'antimoine on aura soin de les polir au papier émeri 00. A ce moment on pourra procéder à l'étalonnage des électrodes, ce qui revient à déterminer le paramètre A spécifique de nos électrodes.

A varie entre 0,175 et 0,0213. Les écarts sont moins forts, surtout quand les électrodes sont en service depuis assez longtemps. La détermination de A se fait au moyen de plusieurs solutions tampons, dont on a préalablement établi le pH au moyen de l'électrode à hydrogène.

Nous décrirons rapidement le fonctionnement de cette électrode à hydrogène.

Nous avons employé l'électrode du type Vlès Vellinger qui est une électrode close d'hydrogène, contenant la pile au calomel, qui dans d'autres électrodes à H (Hildebrand, Sœrensen etc.) est indépendante et doit être reliée à l'électrode d'hydrogène par une jonction liquide au Cl K.

Dans l'appareil de Vlès et Vellinger le contact se fait à travers le boisseau d'un robinet à trois voies, ce qui est très commode.

Le courant d'hydrogène est fourni par une bombe à hydrogène.

Nous devons mettre en contact la solution de pH inconnu, un fil de platine couvert de noir de platine, et une atmosphère d'hydrogène destinée à saturer le noir de platine de la solution.

Comme solution tampon nous avons utilisé 4 sclutions, dont les pH sont compris entre 11 et 4.

Exemple: nous voulons mesurer le pH absolu d'une solution de CO^3Na^2 M/20.

On introduit la solution dans le récipient. On plonge le fil de platine dans la solution et on relie aux bornes du potentiomètre. Le potentiomètre donne directement la valeur en millivolts, équilibrant la pile inconnue. Connaissant la valeur en millivolts, on calcule le pH par la formule suivante:

$$pH = \frac{E - A}{B}$$

Nous opérons à la température de 20°.

A (calomel au K Cl saturé) = 0,2488

B à la température de 20° = 0,0581.

E = 920 mv.

$$pH = \frac{0{,}920 - 0{,}2488}{0{,}0581} = 11{,}14$$

Nous opérons de même avec les autres solutions en laissant chaque fois en contact pendant un temps assez long de façon que la f.e.m. atteigne une valeur stable. (Trois minutes.)

Les autres solutions tampon sont:

1° solution d'acide borique:
M/50 20 cc
solution de borate de soude:
M/20 80 cc pH = 8,89

2° solution d'acide borique:
M/5 90 cc
solution de borate de soude:
M/20 10 cc pH = 7,04

3° solution NaOH N 50 cc
solution CH^3COOH N:
100 cc
H^2O QSP 500 cc pH = 4,62

Une fois qu'on a déterminé le pH absolu de ces solutions on n'a plus besoin de s'occuper de l'électrode à hydrogène, et on n'emploie que les électrodes à antimoine.

Etalonnage des électrodes d'antimoine.

Les électrodes sont étalonnées avant chaque série de mesures. Le liquide de référence est la solution de ClH N/10 (pH = 1,089). Dans le récipient A on introduit la solution de CO^3Na^2 N/20. On plonge les électrodes d'antimoine dans les 2 solutions de manière que la pointe de l'antimoine affleure la surface des solutions. Avant chaque série de mesures on purge le KCl des réservoirs ce qui est facile avec les robinets à 3 voies. L'équilibrage de la f.e.m. demande 3 minutes et la f.e.m. ne change pratiquement pas pendant les 3 minutes suivantes. On fait ainsi avec les 3 autres solutions tampon. Sur un graphique, en fonction des millivolts ainsi mesurés on porte les pH absolus déterminés auparavant; on peut compléter avec le pH de HCl N/10, de référence. Si les opérations sont bien faites, les 5 points déterminent une droite.

$$\text{Le paramètre } A = \frac{\Delta \text{ pH}}{\Delta \text{ E}}$$

Δ pH = pente de la droite.

Δ pH permet de calculer le pH d'une solution inconnue d'après la formule pH = AE+C.

Dans notre cas la solution inconnue est une solution de protéines extraites de la farine. La détermination de pH doit se faire très soigneusement et surtout très rapidement.

Pas d'empoisonnements, exactitude suffisante, rapidité de la mesure, tels sont les avantages de la méthode à l'électrode d'antimoine qui ont motivé notre choix.

Calcul du pH.

pH se calcule par la formule suivante:

$$AE = pH - C$$

$$A = \frac{\Delta\ pH}{\Delta\ E}$$

$$pH = \frac{\Delta\ pH}{\Delta\ E}\ E + C$$

Pratiquement cela revient à marquer sur la droite étalon la valeur en millivolts et d'en déduire le pH. L'erreur ainsi faite ne dépasse pas 0,05 unité pH. A nos solutions de protéines nous avons ajouté petit à petit du réactif de façon à faire ainsi des titrations électrométriques.

Comme réactif titrant nous avons utilisé des solutions de ClH N/10 et NaOH N/10 que nous avons ajoutées goutte à goutte, car l'addition par cc ne nous donnait pas de maxima et minima nets. Les gouttes on été étalonnées au préalable:

1 cc NaOH N/10 = 20 gouttes
1 cc ClH N/10 = 20 gouttes.

Après l'affusion de chaque goutte de réactif on agite, on note, s'il y a lieu l'apparition ou la disparition de louche et on fait la mesure du pH par la méthode décrite plus haut.

Pour suivre les modifications subies par nos solutions nous avons tracé des courbes. Or dans ces sortes de titrations on porte généralement en abscisses les valeurs de pH et en ordonnées les quantités de réactif ajoutées. Dans le cas des protéines on obtient des courbes de neutralisation où les points d'inflexion sont difficilement visibles. Nous avons employé un autre mode de représentation qui s'explique quand on tient compte de l'effet tampon d'une solution.

3° EFFET TAMPON.

Une solution d'électrolytes en équilibre contient des ions H et OH libres et une certaine réserve d'acidité potentielle. Si nous ajoutons une petite quantité de soude à la solution nous allons faire disparaître des ions H libres, mais aussi en faire apparaître de nouveaux à partir de la réserve potentielle. Le pH va augmenter. Si nous continuons à ajouter de la soude jusqu'à la neutralisation nous tracerons une courbe montrant le chemin de pH suivi. La courbe accuse une forme en S. L'expérience a montré que la courbe de neutralisation diffère avec les conditions expérimentales. La même chose se passe si on ajoute de l'acide à un électrolyte possédant des ions OH en liberté.

Selon les corps on remarque que quelquefois il faut des quantités minimes de réactifs pour amener une forte variation de pH. Pour d'autres solutions au contraire on peut constater que de grandes quantités de réactifs ne font pas varier considérablement le pH. Cette résistance à la variation de pH est appelée l'effet tampon. Comme cet effet tampon est

intéressant à connaître on définit un coefficient tampon qui représente pour une solution la difficulté qu'a la solution à suivre les variations de pH. On a $\tau = \frac{\Delta m}{\Delta pH}$ Δm étant la quantité de réactif (acide ou base) ajoutée pour produire une variation ΔpH du pH.

τ varie avec le pH de la solution et n'est pas constant.

Quand on considère la courbe de neutralisation d'un système complexe (protéines) on remarque un ou plusieurs points d'inflexion. Les points d'inflexion correspondent à pK (constante de dissociation des corps). La recherche de ces points d'inflexion est très intéressante pour déterminer pK. L'analyse d'une courbe présentant plusieurs points d'inflexion, est souvent difficile.

Depuis quelque temps on utilise des courbes plus expressives que les simples courbes de neutralisation. Ces courbes appelées courbes coefficient tampon sont la dérivée ou la pente de la courbe de neutralisation. Pour cela on porte en ordonnées le coefficient tampon $\tau = \frac{\triangle m}{\Delta pH}$ Or Δm dans notre cas = une goutte = quantité d'acide ou de base ajoutée à 25 cc de solution et produisant une variation ΔpH. Pour faciliter le tracé des courbes nous pouvons porter en ordonnées ΔpH et en abscisse les valeurs de pH *moyen* compris entre deux extrêmes de la variation ΔpH.

D'après Vlès (41) le coefficient tampon présente un *maximum* au moment où l'on passe par la constante pK. (K étant la constante de dissociation); la courbe des ΔpH, c'est-à-dire la courbe inverse

$1/\tau$ du coefficient tampon τ présentera donc *un minimum* au moment où l'on passe par la constante pK.

Or le point isoélectrique peut être calculé par la moyenne des pK.

En effet, soit: $R\begin{matrix} n\ CH \\ \diagdown \\ \diagup \\ m\ H \end{matrix}$ le schéma d'une protéine; à chacune des n fonctions basiques et des m fonctions acides correspond un pK déterminé, c'est-à-dire une certaine constante d'ionisation. Ce pK se détermine sur la courbe de saturation par la pente de la tangente sur un point d'inflexion. Dans cette valeur du pK, il y a en solution autant de fonctions ionisées que de fonctions saturées du *même type*.

$$R\begin{matrix} n\ OH \\ \diagdown \\ \diagup \\ (m - p/2)\ H + p/2\ Na \end{matrix} \quad \text{et} \quad R\begin{matrix} n\ OH \\ \diagdown \\ \diagup \\ (m - p/2)\ H + p/2\ H \end{matrix}$$

Or un certain nombre de fonctions acides du même type, c'est-à-dire du même pK de toutes les molécules peuvent êtres saturées de façon à équilibrer exactement les fonctions basiques encore libres: il y a passage de la protéine en un point isoélectrique. Certains d'entre eux sont peu importants, d'autres au contraire ont le plus grand retentissement sur l'équilibre et la structure de la protéine (floculation etc.). Il ne faut d'ailleurs pas perdre de vue que si plusieurs fonctions acides et plusieurs fonctions alcalines de pK voisins existent dans une protéine, le point isoélectrique expérimental pourra correspondre à la mise en jeu de fonctions ayant des pK légèrement différents, par une combinaison des saturations réalisées par certaines fonctions,

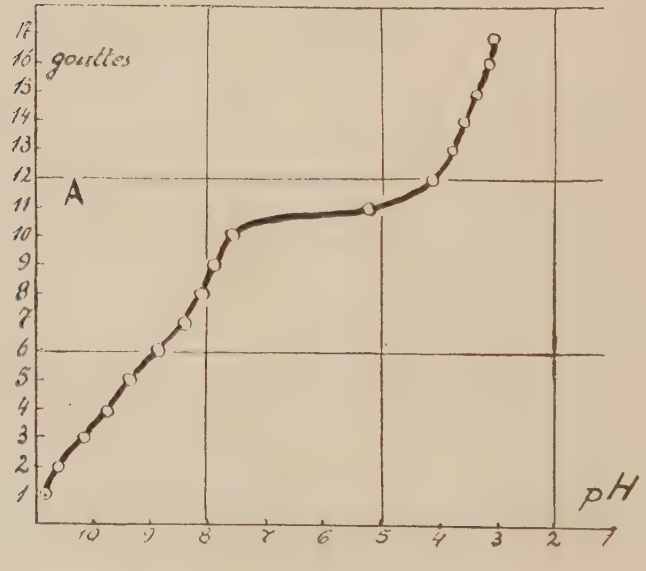
pour un pH donné et d'autres fonctions, pour un pH voisin. Les points iso. ainsi mesurés ne sont pas des points iso. *vrais* comme ceux donnés par la cataphorèse, mais des points iso. *apparents*. La plasticité de la molécule protéique peut d'autre part faire apparaître des points iso., si un clivage ou une rotation vient à se produire dans la molécule à un pH donné. Cependant loin de nuire dans le problème qui nous préoccupe ces points iso. supplémentaires nous aideront à mieux distinguer et classer les protéines. (Voir par ailleurs VLÈS.) (42).

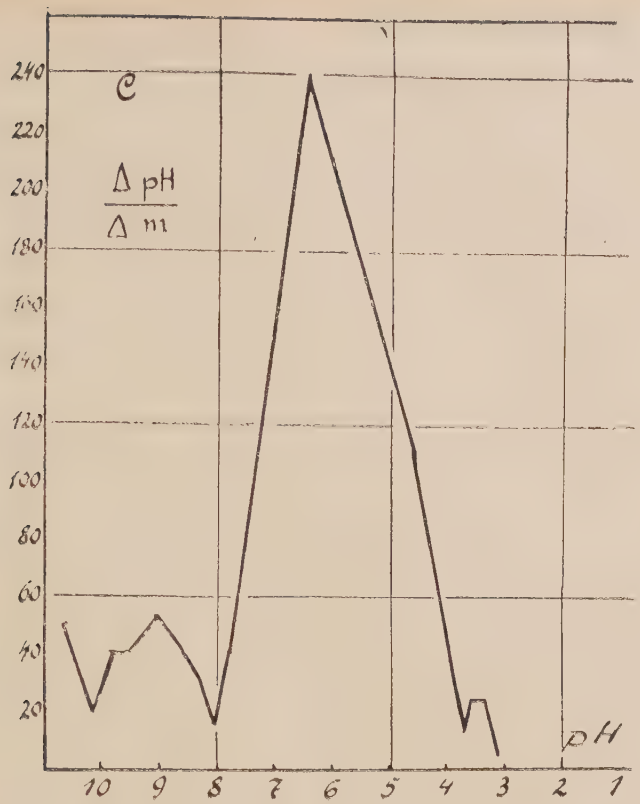
Quoiqu'il en soit, si l'on observe dans la courbe tampon un certain minimum pK_1 puis après un maximum, un nouveau minimum pK_2 nous écrirons

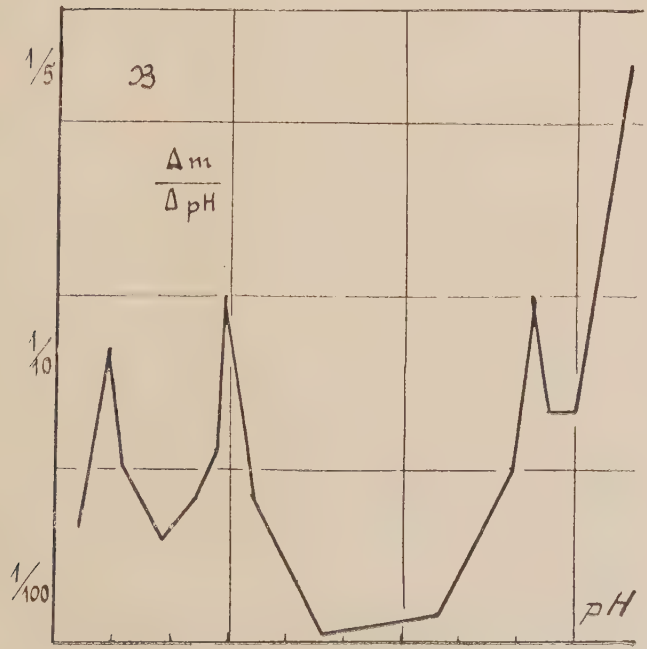
$$\text{point iso.} = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

et nous admettrons que les points iso. apparents sont toujours séparés par deux pK consécutifs.

Graphique 1




C
Δ pH
Δ m
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
pH
10 9 8 7 6 5 4 3 2 1


B
Δ m
Δ pH
1/5
1/10
1/100
pH

Nous avons tracé trois courbes correspondant à une même titration d'une solution de gliadine (tableau 2, page 67).

A. courbe de neutralisation

B. courbe coefficient tampon

C. courbe inverse de la courbe coefficient tampon.

Ces trois courbes sont représentées sur le graphique 1.

L'avantage de l'électrode d'antimoine est qu'elle permet une mesure rapide du pH (5 minutes env. pour chaque point). Par conséquent il est permis de traiter en une heure les solutions de protéines. Cet avantage est d'importance capitale en raison de la grande altérabilité des solutions de protéines que nous ne pouvions songer à stabiliser ou à protéger par des antiseptiques sans risquer d'introduire des difficultés insurmontables.

Avant d'aborder le chapitre des expériences proprement dites nous citerons encore les précautions à prendre dans une étude électrométrique.

I. Les mesures doivent être faites au plus tard quelques heures après les extractions, car les protéines s'hydrolysent facilement; leurs molécules se scindent, les maxima et minima ne sont plus très nets et font place à une infinité de maxima et minima correspondant aux divers produits d'hydrolyse.

II. Les maxima et minima des globulines et albumines d'une part, des gluténines et prolamines d'autre part, sont très rapprochés. Pour une même concentration en protéines on peut alors faire varier la quantité de réactif ajouté. Nous avons toujours ajouté le réactif goutte à goutte. Les mesures de ce

fait sont souvent très longues (jusqu'à 30 mesures pour une titration) ; mais les résultats sont d'autant plus précis.

Malheureusement la détermination du pH après addition de réactif par goutte ne permet le tracé de la courbe E = f (pH) que par points.

Il en résulte que la détermination de la courbe *coefficient tampon* pourra être affectée d'une certaine imprécision dans la place des maxima et minima.

On verra par la suite dans la discussion de nos courbes qu'en répétant la mesure dans les mêmes conditions les pK apparents diffèrent assez peu. Il serait cependant infiniment souhaitable de pouvoir tracer la courbe toute entière par un enregistrement graphique continu. Les petits accidents de cette courbe qui nous échappent par la méthode actuelle pourraient alors être mieux mis en évidence. Nous n'avons pu procéder à de pareilles mesures, car nous ne disposions pas du coûteux matériel nécessaire.

CHAPITRE III.

EXTRACTION DES PROTEINES.

1° PRELIMINAIRES.

Avant de passer aux extractions des protéines et à l'analyse des courbes obtenues nous voudrions parler d'un travail que Tague (40) a entrepris en 1925 en vue d'une détermination des points isoélectriques de la gliadine et de la gluténine. Nous savons que le point iso. d'une substance protéique peut se déterminer de deux façons.

1° par le calcul (point iso. = moyenne des pK)

2° par cataphorèse.

Le deuxième procédé ne donne pas de résultat pour la gliadine car son point iso. est très voisin de pH 7. La gliadine difficilement soluble dans les tampons l'est cependant assez pour entraîner un changement de concentration de solutions assez tamponnées, mais peu chargées en sel.

Tague utilise une solution tampon constituée par un mélange de phosphate monosodique et disodique. (0,01 M).

Si le pH est supérieur au point iso. de la gliadine, l'addition de gliadine augmente le pH.

Si au contraire le pH est inférieur au point iso. de la gliadine, l'addition de gliadine abaisse le pH. Il y aura donc un moment où l'addition de gliadine ne produira pas de variation du pH de la solution tampon, à ce moment nous avons le point iso-électrique de la gliadine.

Tague opère de même pour la gluténine.

Il prépare la gliadine de la façon suivante:

Préparation de la gliadine.

Après avoir bien lavé le gluten, il ajoute de l'alcool à 95°, agite par choc pendant 8 heures et laisse reposer une nuit. Le liquide est filtré sur de l'amiante, évaporé à basse pression et à une température inférieure à 65°. La solution est versée dans 100 volumes d'une solution aqueuse de NaCl à 10 p. 1000. La gliadine précipite. Tague purifie la poudre en la dissolvant plusieurs fois dans l'alcool. Finalement il obtient une poudre blanche parfaitement friable.

Préparation de la gluténine.

Le résidu de l'opération est épuisé par l'alcool à 70°, desséché et repris par l'éther. Le produit ainsi obtenu est solubilisé dans une solution de NaOH à 0,2%, précipité à nouveau par addition ménagée de HCl et lavé par l'eau distillée. Cette opération est répétée 4 ou 5 fois. La poudre est déshydratée par l'alcool absolu et séchée dans le vide sulfurique. La gluténine ainsi obtenue est moins friable que la gliadine.

Résultats.

Tague a fait un dosage d'azote total.

Dans la gliadine il trouve 17,5 de N et dans la gluténine 17,4 de N.

Les points isoélectriques trouvés sont les suivants:

point iso. gliadine = 6,5

point iso. gluténine = 6,8 à 7,00.

L'auteur se propose de rechercher l'influence de l'alcool sur les propriétés acides et basiques; de telle sorte qu'il est possible que sa méthode d'extraction ne donne pas de composés purs.

En 1932 Errera (19) en Belgique, par une méthode électrométrique, a étudié différentes farines. Il a déterminé des points isoélectriques des globulines et albumines qui se trouveraient respectivement entre pH 3 et 4 et pH 5 et 6. Le point iso. de la gliadine se trouverait entre pH 9 et 10. Il emploie le même mode de représentation que nous, mais interprète différemment les résultats.

Errera (19) avait considéré que les minima de ces courbes représentaient les points isoélectriques des protéines. Il ne tenait aucun compte des pK. Nous nous sommes appuyés sur les données de Vlès pour le tracé de nos courbes.

D'autres auteurs (39) ont également étudié les points isoélectriques de la gliadine et de la gluténine. Nous indiquons ci-dessous les résultats obtenus par des auteurs étrangers.

I. Gluténine.

A. Tampon: acide acétique + acétate de sodium.

Japon	5.191—5.478
U. S. A.	5.413—5.575
Canada	5.257—5.425
Australie	5.269—5.426
Mandchourie	5.308—5.556

B. Tampon: $Na^2PHO^4 + KH^2PO^4$.

Japon	4.575—4.820
U. S. A.	4.789—4.923
Canada	4.761—4.975
Australie	4.692—4.889
Mandchourie	4.569—4.786

II. Gliadine.

Tampon: $Na^2PHO^4 + KH^2PO^4$.

Japon	6.430—6.541
Australie	6.408—6.594
U. S. A.	6.473—6.562

On constate par conséquent que les points isoélectriques varient avec les tampons employés, mais en ce qui concerne la gluténine ils diffèrent sensiblement avec les résultats donnés par Tague.

2° EXTRACTION DES PRINCIPALES PROTEINES METHODE CLASSIQUE.

EXTRACTION DE LA GLIADINE ET DE LA GLUTENINE.

La gliadine et la gluténine, principales protéines de la farine, sont extraites, soit de la farine directement, soit du pâton de gluten.

Nous avons essayé plusieurs extractions. Pour avoir les deux produits à l'état pur on peut opérer à partir du gluten.

Préparation du pâton de gluten. (Bertrand) (41).

50 grammes de farine sont triturés dans un petit mortier en porcelaine avec 1/3 du poids d'eau (env. 17 g.). On obtient ainsi un pâton bien homogène qu'on malaxe sous un mince filet d'eau de façon à éliminer l'amidon par entraînement. Le débit de l'eau est réglé (1 goutte par seconde). L'eau doit être légèrement calcaire. Après un malaxage de 40 minutes on vérifie que l'eau d'entraînement ne contient plus d'amidon.

Le résidu est une masse élastique, grisâtre, constitué essentiellement par la gliadine et la gluténine. C'est le gluten. L'eau d'entraînement a enlevé les albumines et globulines ainsi que les sels minéraux contenus dans la farine.

Préparation de la gliadine. (41).

10 gr. de gluten encore humide sont pressés entre 2 feuilles de papier buvard, fragmentés en petits morceaux, et traités par 30 cc d'alcool à 95° plus 5 cc d'eau. Le degré alcoolique est abaissé si on tient compte de l'eau retenue dans le gluten.

On chauffe le tout au B. M. muni d'un réfrigérant ascendant. On agite fréquemment et on fait digérer pendant 24 heures. Après avoir décanté l'alcool on le remplace par de l'alcool à 70°. On chauffe, on agite et on fait à nouveau digérer. Cette opération est répétée 4 ou 5 fois de suite. Les solutions alcooliques sont réunies, filtrées et concentrées

à basse pression et à une température inférieure à 52°. Pour faciliter le départ de l'alcool nous avons adapté au ballon un tube capillaire permettant de petites rentrées d'air. Nous avons purgé cet air en le faisant passer dans un récipient contenant de la lessive de soude.

Le liquide contient la gliadine, seul produit soluble dans l'alcool à 70°. A mesure que la distillation avance le liquide se trouble et la gliadine adhère facilement aux parois du ballon. On ajoute un peu d'alcool pour redissoudre le trouble formé. Ensuite on verse en mince filet dans 8 fois son volume d'eau froide. La gliadine dispersée dans l'eau est filtrée sur amiante et recueillie. On la purifie en dissolvant dans l'alcool et en faisant digérer avec l'éther. Finalement on obtient une poudre blanche, soluble dans l'eau acidifiée ou alcalinisée.

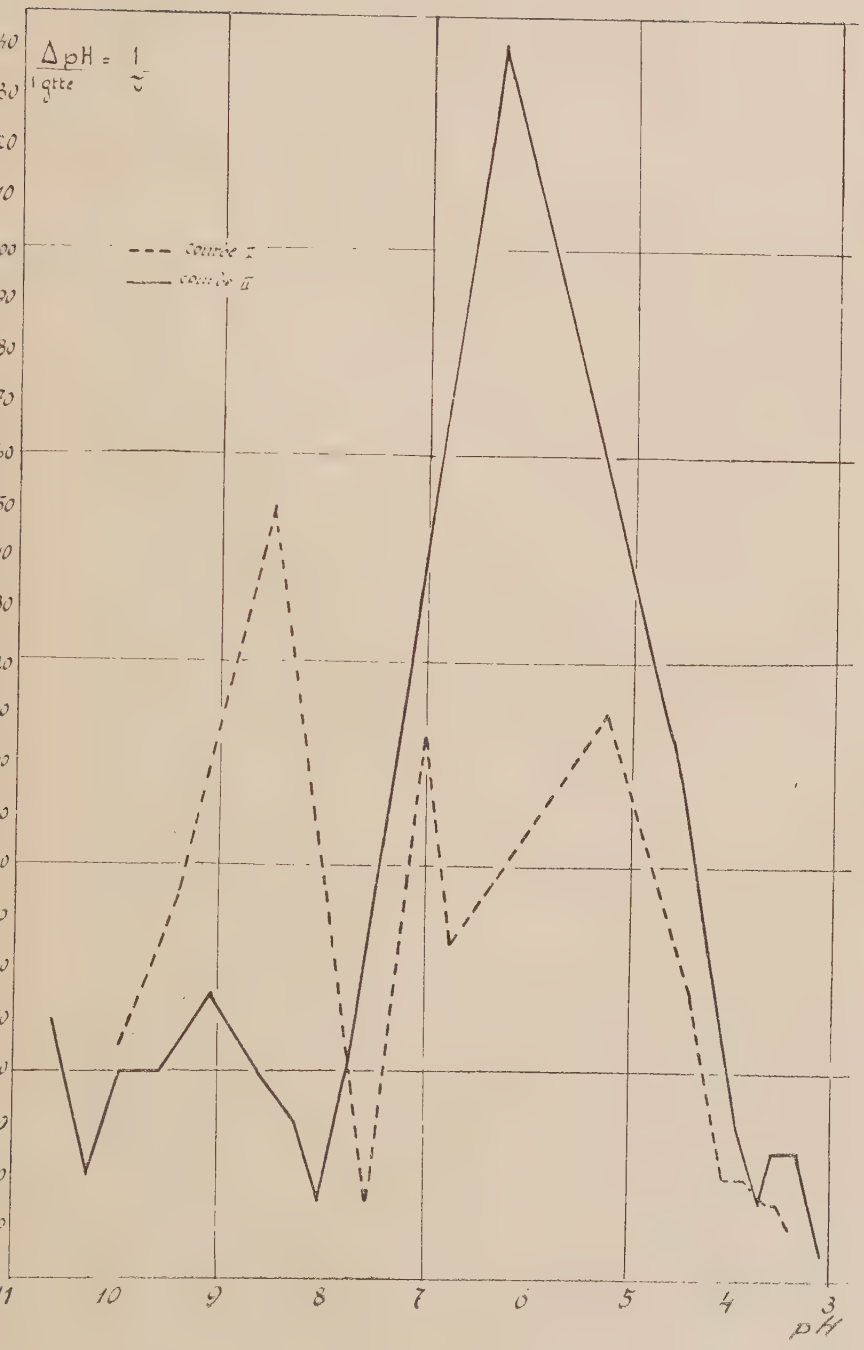
On prélève 0,2 gr. de la poudre ainsi obtenue, on dissout dans 200 cc d'eau alcalinisée avec NaOH ou dans 200 cc d'eau acidifiée avec ClH.

Sur 25 cc de cette solution on fait la titration électrométrique en ajoutant goutte à goutte le réactif titrant. Les résultats tirés des tableaux I et II sont traduits sur le graphique 2.

Préparation de la gluténine (41).

Le résidu de l'extraction précédente est constitué par la gluténine. Les fragments sont séchés, pulvérisés et épuisés à l'alcool à 70° pour s'assurer qu'il ne reste plus de gliadine. On fait digérer avec de l'éther. Après ces purifications successives on a une poudre grisâtre qu'on peut dissoudre dans 30-40 cc de KOH à 2%. On neutralise par HCl dilué. La gluténine est filtrée, lavée et recueillie. Pour la titration

Graphique 2



électrométrique on opère comme pour la gliadine en dissolvant dans une solution alcaline. Les résultats sont traduits dans la courbe VI, graphique 5. (Tableau VII, page 77.)

EXTRACTION DES GLOBULINES ET ALBUMINES.

Les albumines et globulines sont solubles dans les solutions de sels neutres. On extrait ces deux protéines directement de la farine.

Les épuisements par la solution chlorurée sont classiques et ont été utilisés depuis longtemps par les Américains (Jago) qui emploient une solution de ClK à 5% ou une solution de SO^4K^2. En Europe on utilise surtout les solutions de NaCl de 5-10% et on opère généralement de la manière suivante:

6 gr. de farine sont délayés dans 50 cc de solution extractive. On agite pendant deux heures, on centrifuge pendant 45 minutes. Comme notre étude n'exige pas de produits très purs nous n'avons pas besoin de séparer la globuline de l'albumine. Nous avons essayé cette méthode classique.

3° EXTRACTION DES PROTEINES; METHODE NOUVELLE DE Javillier (18).

Nous nous sommes proposés d'appliquer la mesure électrométrique à la méthode d'extraction que Javillier a mise au point récemment. Cette méthode est très avantageuse si l'on a peu de farine à sa disposition. En effet on opère sur 2 gr. de farine délipidée auparavant.

On fait 4 extractions:

1° épuisement chloruré pour extraire l'albumine et la globuline,

2° épuisement à l'alcool à 70° neutre (gliadine),

3° épuisement à l'alcool à 70° additionné de 3 p. 1000 de KOH à l'alcool,

4° le résidu est constitué par la gluténine.

Ce qui différencie cette méthode des autres, c'est l'emploi de l'alcool potassé qui semble extraire une substance non encore définie jusqu'à présent.

Javillier détermine les quantités d'azote libéré à chaque épuisement. Il montre que la valeur boulangère de la farine varie avec le rapport N_2 et N_3, quantités d'azote de 2e et 3e épuisement. Notre méthode électrométrique nous permettra de différencier les diverses protéines, grâce à leur point isoélectrique.

Pour faire les différentes extractions nous avons essayé la méthode de Javillier. Elle a nécessite moins de temps que les méthodes classiques qui demandaient 2 heures d'agitation. Comme les extractions et les mesures électrométriques doivent se suivre de très près (hydrolyse) cette méthode nous a semblé très avantageuse.

Description détaillée de la méthode.

Javillier préconise l'emploi de la farine délipidée, car les matières grasses peuvent gêner le dosage de l'azote.

10 gr. de farine sont délipidés avec 100 cc d'éther de pétrole (distillant de 30-40°) employé en plusieurs fois. La farine est versée dans un tube de diamètre de 2 cm, effilé à l'une des extrémités. On bouche l'extrémité effilée par un tampon de coton et on verse l'éther. On règle le débit de façon qu'il y ait une goutte par seconde. Le liquide qui passe a une couleur jaune due aux lipides. La farine

ainsi traitée est séchée dans un cristallisoir et conservée dans un tube à essai bien bouché. On prélève 2 gr. de cette farine délipidée et on fait les extractions successives.

Epuisement chloruré.

Les 2 gr. de farine sont délayés dans un petit mortier en verre poli avec 50 cc d'une solution de NaCl à 10%. On verse la solution par petites quantités de façon que le liquide soit bien homogène. Le liquide est transvasé dans une fiole qu'on adapte dans un agitateur circulaire. On agite pendant 20 minutes, puis on verse le liquide dans deux tubes de centrifugeuse. On centrifuge pendant 20 minutes, la centrifugeuse tournant à 2000 tours par minute. Le liquide clair est décanté dans une fiole jaugée de 200 cc. Le culot de centrifugation est délayé de nouveau avec 50 cc de solution de NaCl. La solution bien homogène est agitée et centrifugée. On décante le liquide clair dans la fiole jaugée et on complète à 200 cc. On prélève 25 cc de cette solution. L'étalonnage de l'électrode d'antimoine une fois fait, nous versons la solution dans le réservoir S_1. Le pH initial de la solution est déterminé en premier lieu; puis nous faisons la titration électrométrique avec HCl N/10 ajouté goutte à goutte; entre chaque addition d'acide il faut toujours bien agiter avec un agitateur en verre qui séjournera dans la solution pendant toute la série de mesures.

Les titrations avec HCl N/10 nous donnent des valeurs de pH dans la région acide. Or, il paraissait intéressant d'avoir toute la gamme de pH 11 à pH 2. Nous recommençons donc la titration avec NaOH

N/10. La solution versée, on rince bien le réservoir et on introduit encore 25 cc de solution. On opère de la même façon que précédemment. Cette titration nous donne les valeurs de pH dans la région alcaline. Or, nous avons toujours constaté que la titration avec NaOH N/10 n'était nullement intéressante dans le cas des albumines et globulines. Nous avons entièrement laissé de côté la titration alcaline et n'avons conservé que les courbes nous donnant des points iso. dans la région acide.
les résultats sont traduits dans les courbes XI et XII, tirées des tableaux XIII et XIV, graphique 8, page 85.

Extraction alcoolique.

Le résidu de l'extraction chlorurée est transvasé dans le mortier en verre. On dilue avec 50 cc d'alcool à 70° qu'on ajoute petit à petit de façon à avoir un liquide homogène. On verse dans la fiole de la machine à agiter, on agite pendant 20 minutes, on centrifuge et on décante dans la fiole jaugée de 200 cc. On recommence la même opération avec 50 cc d'alcool à 70°. On agite, on centrifuge et on décante dans la fiole jaugée puis on complète à 200 cc. Comme on ne peut mesurer le pH d'une solution alcoolique nous sommes obligés de distiller l'alcool. Comme d'autre part les protéines s'altèrent si on dépasse la température de 60°, nous distillons l'alcool à pression réduite et à la température inférieure à 40°. La distillation demande environ 2 heures. Quand le volume est réduit à quelques cc, on transvase dans une fiole et on complète à 200 cc. Comme la gliadine est insoluble dans l'eau on ajoute soit ClH N/10 ou NaOH N/10, la gliadine étant

soluble dans les solutions faiblement acides ou alcalines. On prélève 25 cc qu'on verse dans le réservoir S_1 de l'électrode d'antimoine. Suivant que la solution est acide ou alcaline on titre avec NaOH N/10 ou ClH N/10, ces réactifs étant ajoutés goutte à goutte.

Les résultats sont traduits dans courbes IV et V, tirées du Tableau IV et V.

Extraction à l'alcool potassé.

Le résidu de l'extraction alcoolique est repris par 50 cc d'alcool à 70° additionné de 3 p/1000 de KOH. On agite, centrifuge et on décante le liquide. On commence l'opération avec 50 cc d'alcool potassé et on complète à 200 cc. On distille l'alcool à pression réduite et à une température inférieure à 40°, et on opère comme pour la gliadine. La solution étant très alcaline il faut ajouter de 40 à 100 gouttes de ClH N/10 pour amener la solution à un pH voisin de 11. On titre la solution en ajoutant ClH N/10 goutte à goutte.

Les résultats sont traduits dans les courbes VIII, IX et X déduites des tableaux IX, X et XI, pages 82 et 85.

Extraction de la gluténine.

La gluténine est constituée par le résidu des opérations précédentes. Cette gluténine est soluble dans l'acide acétique. Nous avons fait la dissolution et nous avons essayé de faire la titration électrométrique. Malheureusement le pouvoir tampon de CH^3 COOH est très grand et nous n'avons pu obtenir de résultats. Pour analyser la gluténine nous avons

dissous le résidu dans une solution alcaline (200 cc) et nous avons titré avec ClH N/10 ajouté goutte à goutte.

Les résultats sont traduits dans la courbe VII, tirée du Tableau VIII, graphique 8.

Dans la méthode Javillier nous avons toujours opéré sur 2 gr. de farine dans des conditions tout à fait identiques. Nous avons utilisé une farine pure de Manitoba, délipidée auparavant. Nous avons une fois pour toutes analysé les solutions extractives et nous avons calculé l'azote correspondant à chaque fraction. Les résultats ont été les suivants:

N_1 (1re extraction) = 390 mg. (albumine et globuline)
N_2 (2e extraction) = 830 mg. (gliadine)
N_3 (3e extraction) = 510 mg. (protéine de Javillier)
N_4 (gluténine) = 220 mg.

N total = 1950 mg.

EXTRACTION DIRECTE SUR LA FARINE.

Gliadine extraite directement de la farine.

Comme nos titrations électrométriques n'exigent pas des produits purifiés nous avons essayé d'extraire la gliadine directement de la farine.

2 gr. de farine de Manitoba délipidée sont agités avec 50 cc d'alcool à 70°, centrifugés pendant 20 minutes. Le liquide clair est décanté et le résidu repris par 50 cc d'alcool à 70°. Les deux liquides sont réunis et complétés à 200 cc. L'alcool est évaporé à pression réduite et à une température inférieure à 40°. On complète avec de l'eau distillée à 200 cc. On alcalinise légèrement.

Sur 25 cc on fait la titration électrométrique comme précédemment. Les résultats sont traduits dans la courbe III, tirée du Tableau III, page 49.

Action directe de l'alcool potassé sur la farine.

De même qu'on peut faire agir l'alcool à 70° directement sur la farine, on peut essayer l'action directe de l'alcool potassé sur la farine délipidée. On opère de la même façon que pour la gliadine (2 gr. de farine + 2 fois 50 cc d'alcool potassé. Agiter, centrifuger, évaporer l'alcool et titrer par ClH N/10).

Les résultats sont traduits dans la courbe X, tirée du Tableau XI, page 85.

CHAPITRE IV.

ANALYSE DES GRAPHIQUES.

Ayant décrit nos méthodes d'extraction, nous allons, partant des principes exposés au Chapitre III, déduire de nos courbes les pK, puis les points iso. apparents des protéines.

ETUDE GRAPHIQUE DE LA GLIADINE.

GLIADINE OBTENUE A PARTIR DU PATON DE GLUTEN. (page 55).

On prélève 0,2 gr. de gliadine purifiée. On dissout dans 200 cc d'eau acidifiée par HCl en Q.S. pour dissoudre la gliadine,

Sur 25 cc de cette solution on fait la titration électrométrique en ajoutant NaOH N/10 goutte à goutte.

TABLEAU I.

E mv.	pH	Δ pH	pH moyen
118	3,35		
123	3,45	10	3,40
132	3,60	15	3,52
140	3,75	15	3,67
149	3,95	20	3,85
159	4,15	20	4,05
186	4,70	55	4,42
245	5,80	110	5,25
269	6,45	65	6,77
293	7,50	105	7,
344	7,65	15	7,57
424	9,15	150	8,50
467	9,90	75	9,42
487	10,35	45	9,97

Voir graphique 2, courbe 1.

Cette courbe présente un certain nombre de maxima et de minima. Les minima sont les pK, les maxima sont les points de saturation des protéines. Nous avons calculé les points isoélectriques apparents par les moyennes des deux pK apparents les plus rapprochés comme il a été dit plus haut.

pK_1 = 6,77
pK_2 = 7,57

14,34

Ex.

point iso. app. = 7,17

GLIADINE OBTENUE A PARTIR DU GLUTEN.

Au lieu de dissoudre la gliadine dans l'eau acidifiée on dissout 0,2 à 0,3 gr. dans 200 cc d'une

solution alcaline et on titre par ClH N/10 ajouté goutte à goutte.

TABLEAU II.

E mv.	pH	Δ pH	pH moyen
512	10,85	50	10,60
485	10,35	20	10,25
478	10,15	40	9,95
457	9,75	40	9,55
436	9,35	55	9,07
406	8,80	40	8,60
382	8,40	30	8,25
368	8,10	15	8,02
358	7,95	40	7,75
338	7,55	240	6,35
211	5,15	105	4,62
158	4,10	30	3,95
140	3,80	15	3,72
133	3,65	25	3,57
122	3,40	25	3,32
109	3,15	5	3,12
106	3,10		

Voir graphique 2, courbe II.

Au pH 4,10 on observe une floculation de la protéine. Les pK trouvés sont:

a) pK_1 = 3,72
pK_2 = 8,02
11,74
point iso. app. = 5,87

b) pK_2 = 8,02
pK_3 = 10,25
18,27
point iso. app. = 9,13

GLIADINE EXTRAITE DIRECTEMENT DE LA FARINE.

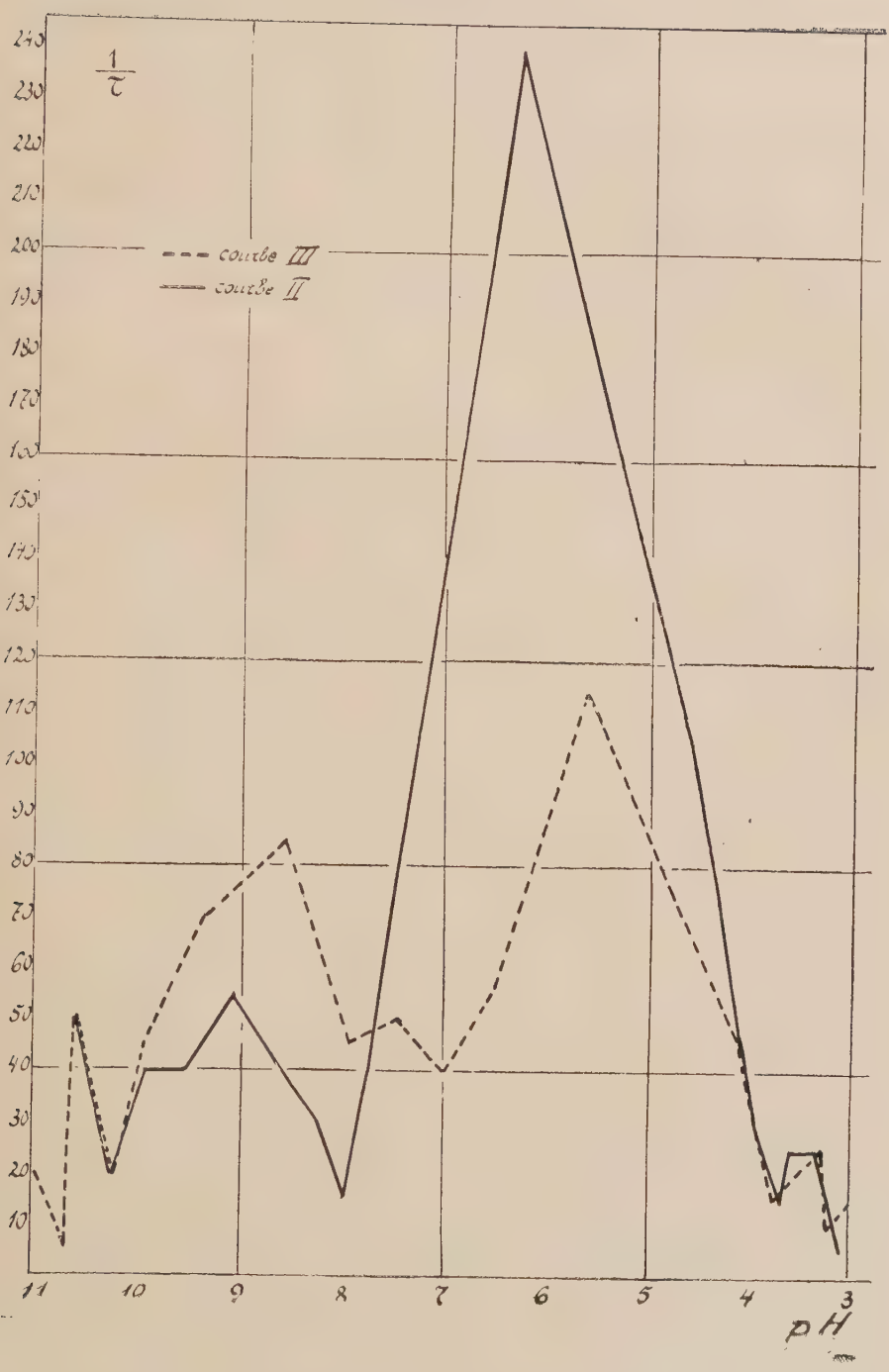
2 gr. de farine de Manitoba, délipidée, sont agités avec 2 fois 50 cc d'alcool à 70°, centrifugés. La solution alcoolique est évaporée et le résidu dans 200 cc d'eau alcalinisée. On titre avec HCl N/10 ajouté goutte à goutte.

TABLEAU III.

E mv.	pH	Δ pH	pH moyen
501	11,65		
494	11,50	15	11,57
491	11,40	10	11,45
475	11,10	30	11,25
464	10,90	20	11,
462	10,85	5	10,87
437	10,35	50	10,60
424	10,15	20	10,25
399	9,70	45	9,95
364	9,	70	9,35
321	8,15	85	8,57
300	7,70	45	7,92
275	7,20	50	7,45
254	6,80	40	7,
226	6,25	55	6,55
166	5,10	115	5,65
125	4,30	80	4,70
100	3,85	45	4,07
84	3,70	15	3,77
79	3,50	20	3,60
70	3,25	25	3,37
63	3,15	10	3,20
59	3,	15	3,07

Voir graphique 3, courbe III.

Graphique 3


1/τ
courbe III
courbe II
240
230
220
210
200
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
11
10
9
8
7
6
5
4
3
pH

a) pK_1 = 3,77
pK_2 = 7,
10,77
point iso. app. = 5,38
b) pK_2 = 7,92
pK_3 = 10,25
18,17
point iso. app. = 9,08

GLIADINE OBTENUE SUIVANT LA METHODE JAVILLIER (décrite page 58).

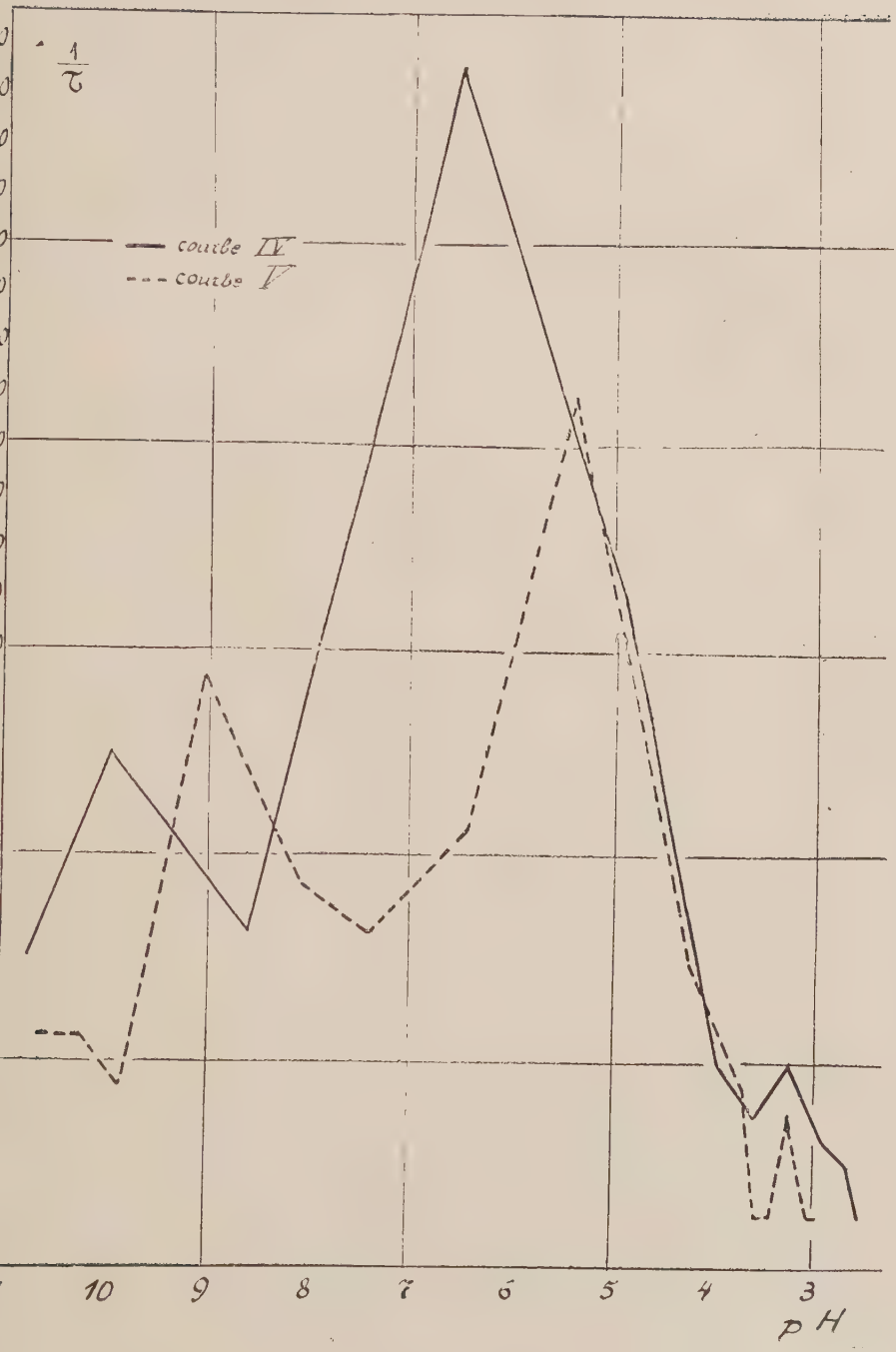
La solution acide est titrée par NaOH N/10.

TABLEAU IV.

E mv.	pH	Δ pH	pH moyen
92	2,50		
96	2,60	10	2,55
102	2,80	20	2,70
115	3,05	25	2,92
132	3,45	40	3,25
150	3,75	30	3,60
175	4,15	40	3,95
239	5,45	130	4,80
351	7,90	235	6,50
434	9,45	65	8,60
485	10,45	100	9,95
513	11,05	60	10,75

Voir graphique 4, courbe IV.
pK_1 = 3,6
pK_2 = 8,6
12,2
point iso. app. = 6,1

Graphique 4



GLIADINE JAVILLIER.

La solution alcaline est titrée par HCl N/10.

TABLEAU V.

E mv.	pH	Δ pH	pH moyen
498	10,90		
473	10,45	45	10,67
450	10,	45	10,22
431	9,65	35	9,82
371	8,50	115	9,05
333	7,75	75	8,15
298	7,10	65	7,42
253	6,25	85	6,45
167	4,55	170	5,40
136	3,95	60	4,25
119	3,60	35	3,70
112	3,50	10	3,55
108	3,40	10	3,45
100	3,10	30	3,25
93	3,	10	3,05
88	2,90	10	2,95

Voir graphique 4, courbe V.

a) pK_1 = 3,25
pK_2 = 7,42
10,67
point iso. app. = 5,33

b) pK_2 = 7,42
pK_3 = 9,82
17,24
point iso. app. = 8,62

Tableau comparatif des points isoélectriques de la gliadine donnés par les différentes méthodes.

TABLEAU VI.

Gliadine gl. sol. acide C. I.	Gliadine gl. sol. alcal. C. II.	Gliadine farine sol. alcal C III.	Gliadine Jav. sol. acide C. IV.	Gliadine Jav. sol. alcal. C. V.
ot. iso : 7.17	a) pt. iso : 5.87 b) pt. iso : 9.13	a) pt. iso : 5.38 b) pt. iso : 9.08	pt. iso : 6.10	a) pt. iso : 5 33 b) pt. iso : 8.62

COMPARAISON DES COURBES.

D'après ce tableau on peut déjà constater que la gliadine en solution alcaline présente toujours deux points iso., l'un au voisinage de 5,3 et l'autre vers 9.

Nous avons construit trois graphiques. Dans chacun nous avons superposé deux courbes, ce qui permettra de facilement se rendre compte des analogies et des différences.

En présence de tous ces résultats on peut se demander si les réactifs employés, ou les extractions ne jouent pas de rôle pour l'obtention des points iso.

Etudions:

I. *l'effet des réactifs.*

Pour cela nous comparons les courbes I et II (graphique 2). La gliadine était obtenue de manière identique à partir du gluten. Or, on constate que si on dissout la gliadine dans une solution acide, son point iso. est plus élevé que si on la dissout dans la solution alcaline (7,17 et 5,87).

Si on admet que la dissolution de la gliadine en solution acide produit une altération de la molécule protéique dans un sens, et la dissolution en solution alcaline, une altération dans un sens contraire, on pourrait facilement supposer que le point iso. apparent soit la moyenne des points iso. calculés dans le premier et dans le deuxième cas. On aurait alors: point iso. app. de la gliadine =

$$\frac{7{,}17 + 5{,}87}{2} = 6{,}52.$$

Ce point iso. app. ainsi trouvé coïnciderait bien avec les points iso. trouvés par Tague (6,5) et les autres auteurs cités plus haut (6,4).

Errera (19) dans sa méthode, avait attribué à la gliadine un point iso. situé entre pH 9 et pH 10, point iso. que nous retrouvons si nous dissolvons la gliadine dans une solution alcaline (résultats traduits dans courbes II et III: points iso. trouvés = 9,13 et 9,08).

II. *L'effet de l'extraction.*

Comparons les courbes II et III (graphique 3). Dans les deux cas la gliadine a été solubilisée dans une solution alcaline. Les points iso. trouvés étaient les suivants: 5,87 et 9,13 (courbe II) et 5,38 et 9,08 (courbe III). On peut constater qu'aux erreurs d'expérience près les points iso. trouvés dans les deux cas coïncident. On peut en conclure que l'extraction à partir du gluten ou à partir de la farine directement n'a aucune influence sur les points iso. app. de la gliadine.

III. *L'effet des réactifs sur la gliadine Javillier.*

Comparons les courbes IV et V (graphique 4). La gliadine, dans les deux cas, a été obtenue de la même manière, c'est-à-dire d'après la méthode de Javillier. Comme dans la comparaison des courbes I et II on peut constater que la solution acide élève le point iso. (6,10) tandis que la solution alcaline abaisse le point iso. (5,33). D'autre part les points iso. app. de la gliadine Javillier en solution alcaline (5,33 et 8,62) sont inférieurs aux points iso. app. de la gliadine extraite du gluten en solution alcaline (5,87 et 9,13). De même le point iso. de la gliadine Javillier en solution acide (6,10) est inférieur au point iso. de la gliadine extraite du gluten en solution acide (7,17). Il est possible que ce soit l'action de NaCl agissant d'abord sur la farine, qui produise cet effet. D'après cette comparaison toute opération superflue serait donc à éviter.

RESUME DES RESULTATS OBTENUS.

La gliadine extraite par l'alcool neutre à 70° voit son point isoélectrique apparent modifié par le mode de dissolution. La dissolution dans l'acide déplace le point isoélectrique de + 1/2 unité pH et la dissolution dans l'alcali déplace le point isoélectrique de — 1/2 unité pH (résultat des tableaux I et III).

Extraite du gluten ou extraite directement de la farine le point isoélectrique reste sensiblement le même (résultat du tableau II).

Ce point nous apparaît donc bien comme une caractéristique de la protéine.

D'autre part on peut se rendre compte que trop de manipulations (purification excessive, extraction préalable des albumines et globulines) ne peuvent qu'altérer la protéine. Dans une étude électrométrique toute purification chimique trop poussée serait à éviter, ce que TAGUE d'ailleurs s'était déjà proposé d'étudier.

2° ETUDE GRAPHIQUE DE LA GLUTENINE.

GLUTENINE OBTENUE A PARTIR DU GLUTEN.

On prélève 0,2 gr. de gluténine purifiée. On dissout dans 200 cc d'eau alcalinisée (NaOH en q. s. pour dissoudre la gluténine).

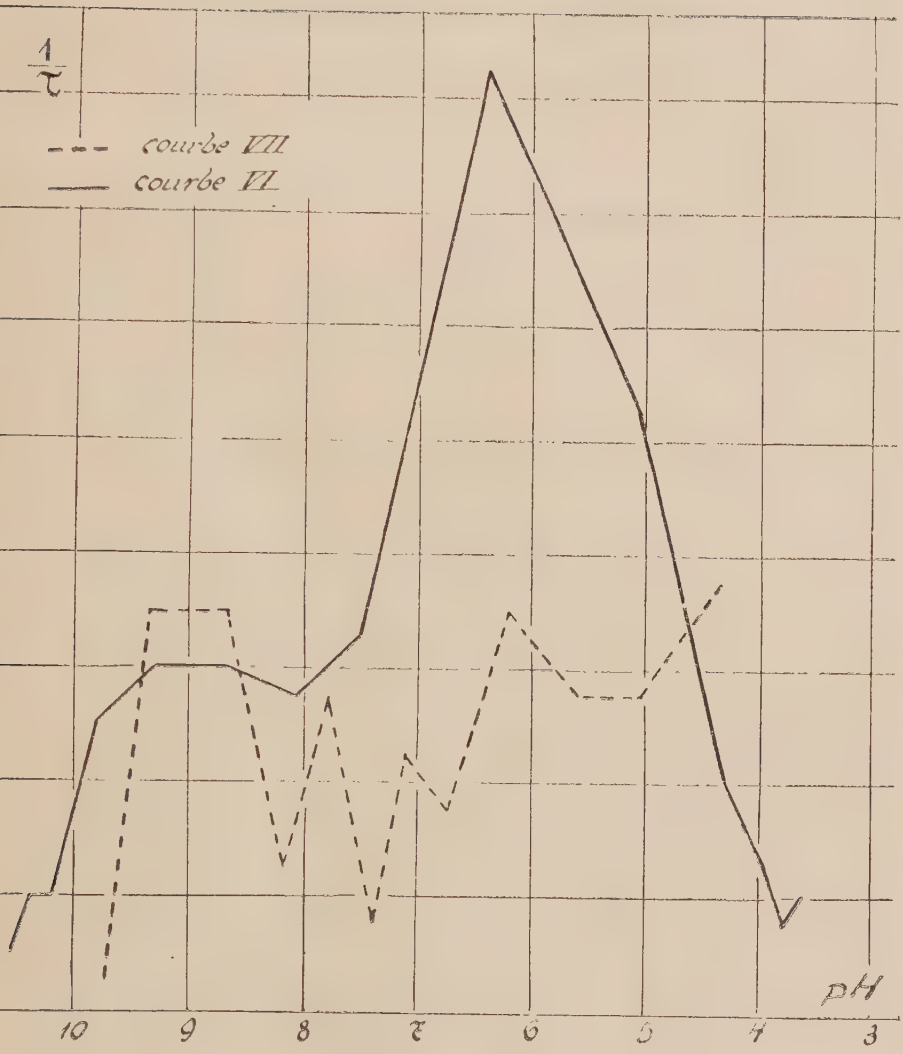
Sur 25 cc de cette solution on fait la titration en ajoutant HCl N/10 goutte à goutte.

TABLEAU VII.

E mv.	pH	Δ pH	pH moyen
515	10,80		
503	10,60	20	10,70
496	10,50	10	10,55
483	10,30	20	10,40
473	10,10	20	10,20
449	9,60	50	9,85
417	9,	60	9,30
387	8,40	60	8,70
355	7,85	55	8,07
319	7,20	65	7,52
231	5,55	165	6,37
180	4,50	105	5,02
158	4,10	40	4,30
146	3,85	25	3,97
136	3,70	15	3,77
126	3,50	20	3,60

Voir graphique 5, courbe VI.

Graphique 5



a) pK_1 = 3,77
pK_2 = 8,07
11,84
point iso. app. = 5,92

b) pK_2 = 8,07
pK_3 = 10,70
18,77
point iso. app. = 9,38

GLUTENINE OBTENUE D'APRES LA METHODE JAVILLIER.

On dissout le résidu de toutes les opérations dans 200 cc d'eau alcalinisée et on titre par HCl N/10 ajouté goutte à goutte.

TABLEAU VIII.

E mv.	pH	Δ pH	pH moyen
456	9,75		
452	9,70	5	9,72
415	9,	70	9,35
378	8,30	70	8,65
363	8,05	25	8,17
334	7,50	55	7,77
326	7,35	15	7,42
302	6,90	45	7,12
285	6,55	35	6,72
248	5,85	70	6,20
219	5,30	55	5,57
190	4,75	55	5,02
153	4,	75	4,37

Voir graphique 5, courbe VI.

a) pK_1 = 5,02
pK_2 = 6,72

11,74

point iso. app. = 5,87

b) pK_1 = 6,72
pK_2 = 7,42

14,14

point iso. app. = 7,07

c) pK_1 = 7,42
pK_2 = 8,17

15,59

point iso. app. = 7,79

ETUDE GRAPHIQUE DE LA PROTEINE JAVILLIER EXTRAITE PAR L'ALCOOL POTASSE.

3e extraction de la méthode Javillier.

La solution très alcaline est acidifiée par HCl N/10, puis retitrée par NaOH N/10 ajouté goutte à goutte.

TABLEAU IX.

E mv.	pH	Δ pH	pH moyen
64	2,60		
80	2,75	15	2,67
86	3,10	35	2,95
96	3,55	45	3,32
114	3,70	15	3,62
133	4,10	40	3,90
176	4,95	85	4,52
204	5,55	60	5,25
227	6,	45	5,77

TABLEAU IX (suite).

E mv.	pH	Δ pH	pH moyen
243	6,35	35	6,17
253	6,55	20	6,45
267	6,85	30	6,70
279	7,10	30	6,97
294	7,40	25	7,25
326	8,05	65	7,72
369	8,95	90	8,50
392	9,45	50	9,20
422	10,05	60	9,70
436	10,35	30	10,20
440	10,45	10	10,40
450	10,65	20	10,55
463	10,90	25	10,77
473	11,10	20	11,
492	11,50	40	11,30
500	11,70	20	11,60

Voir graphique 6, courbe VIII.

a) pK_1 = 3,62
pK_2 = 6,45
10,07
point iso. app. = 5,03

b) pK_2 = 6,97
pK_3 = 9,20
16,17
point iso. app. = 8,08

c) pK_3 = 9,20
pK_4 = 10,40
19,60
point iso. app. = 9,80

PROTEINE DE JAVILLIER.

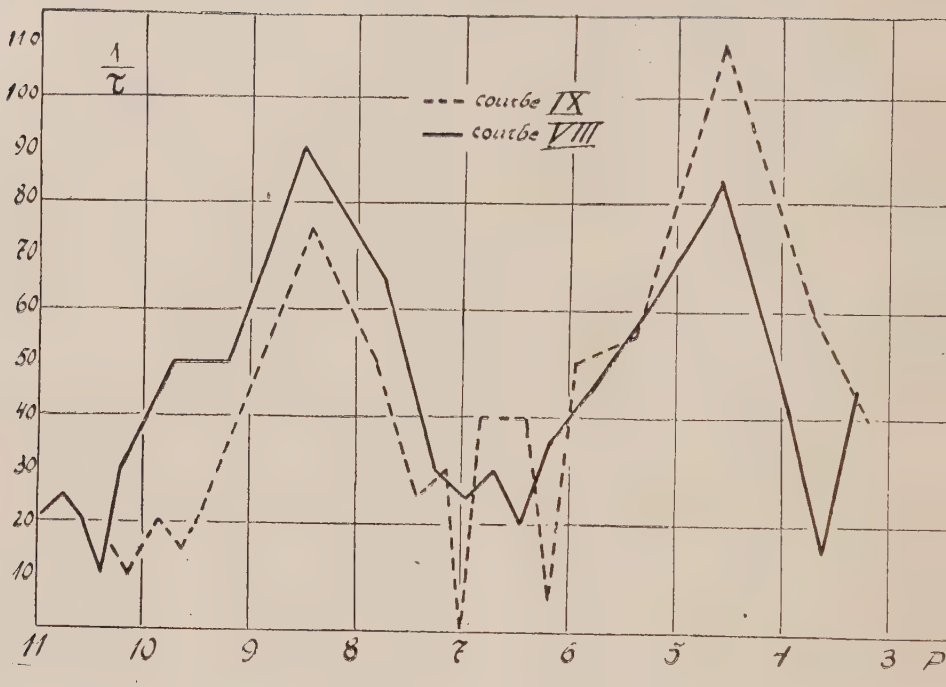
La solution très alcaline est titrée directement par ClH N/10 ajouté goutte à goutte. La protéine a été obtenue de la même façon que celle de la courbe VIII.

TABLEAU X.

E mv.	pH	Δ pH	pH moyen
468	10,35		
461	10,20	15	10,27
455	10,10	10	10,15
447	9,95	15	10,02
439	9,75	20	9,85
429	9,60	15	9,67
418	9,40	20	9,50
389	8,80	60	9,10
347	8,05	75	8,42
323	7,55	50	7,80
310	7,30	25	7,42
295	7,	30	7,15
294	7,	00	7,
293	7,	00	7,
274	6,60	40	6,80
252	6,20	40	6,40
250	6,15	05	6,17
225	5,65	50	5,90
196	5,10	55	5,37
140	4,	110	4,55
110	3,40	60	3,70
93	3,	40	3,20
88	2,85	15	2,92

Voir graphique 6, courbe IX.

Graphique 6



a) pK_1 = 6,17
pK_2 = 7,
13,17
point iso. app. = 6,58

b) pK_2 = 7,
pK_3 = 9,67
16,67
point iso. app. = 8,33

c) pK_3 = 9,67
pK_4 = 10,15
19,82
point iso. app. = 9,91

ALCOOL POTASSE AGISSANT DIRECTEMENT SUR LA FARINE.

La solution alcaline est titrée par HCl N/10 ajouté goutte à goutte.

TABLEAU XI.

E mv.	pH	Δ pH	pH moyen
518	10,95	25	10,82
502	10,70	25	10,57
491	10,45	35	10,27
474	10,10	60	9,80
441	9,50	85	9,08
396	8,65	63	8,35
363	8,02	27	7,87
349	7,75	25	7,62
334	7,50	35	7,32
319	7,15	45	6,92
292	6,70	95	6,22
245	5,75	100	5,25
190	4,75	100	4,25
140	3,75	10	3,70
134	3,65	20	3,55
123	3,45	15	3,37
116	3,30	15	3,22
108	3,15	10	3,10
103	3,05	10	3,
98	2,95	5	2,92
95	2,90	5	2,87
92	2,85		

Voir graphique 7, courbe X.

a) pK_1 = 3,70

pK_2 = 7,62

11,32

point iso. app. = 5,66

b) pK_1 = 7,62
pK_2 = 10,57

18,19

point iso. app. = 9,09

TABLEAU XII.

Tableau comparatif des points isoélectriques de la gluténine et de la protéine extraite par l'alcool potassé.

Gluténine glut. sol. alcal. C. VI.	Gluténine Jav. sol. alcal. C. VII.	Extr. alc. pot. Jav. sol. acidif. C. VIII.	Extr. alc. pot. Jav. sol. alcal. C. IX.	Extr. alc. p sur farine sol. alc. C.
a) pt. iso : 5.92	a) pt. iso : 5.87	a) pt. iso : 5.03	a) pt. iso : 6.58	a) pt. iso :
b) pt. iso : 9.03	b) pt. iso : 7.07	b) pt. iso : 8.08	b) pt. iso : 8.33	b) pt. iso :
	c) pt. iso : 7.79	c) pt. iso : 9.80	c) pt. iso : 9.91	

COMPARAISON DES COURBES.

Comme pour la gliadine, nous avons superposé, sur un même tableau les courbes intéressantes à comparer.

Nous étudions:

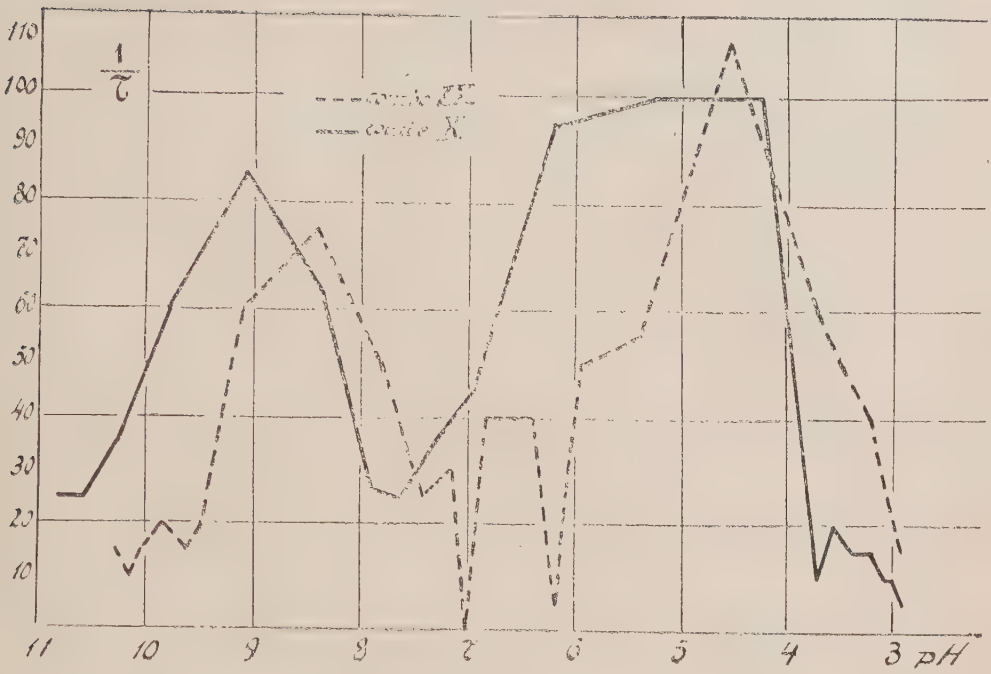
I) *l'effet des réactifs.* (Courbes VIII et IX)

La dissolution dans l'acide fait apparaître un point isoélectrique nouveau à pH 5,03. Les autres points isoélectriques restent les mêmes (8,08 et 8,33) (9,08 et 9,91). (graphique 6.)

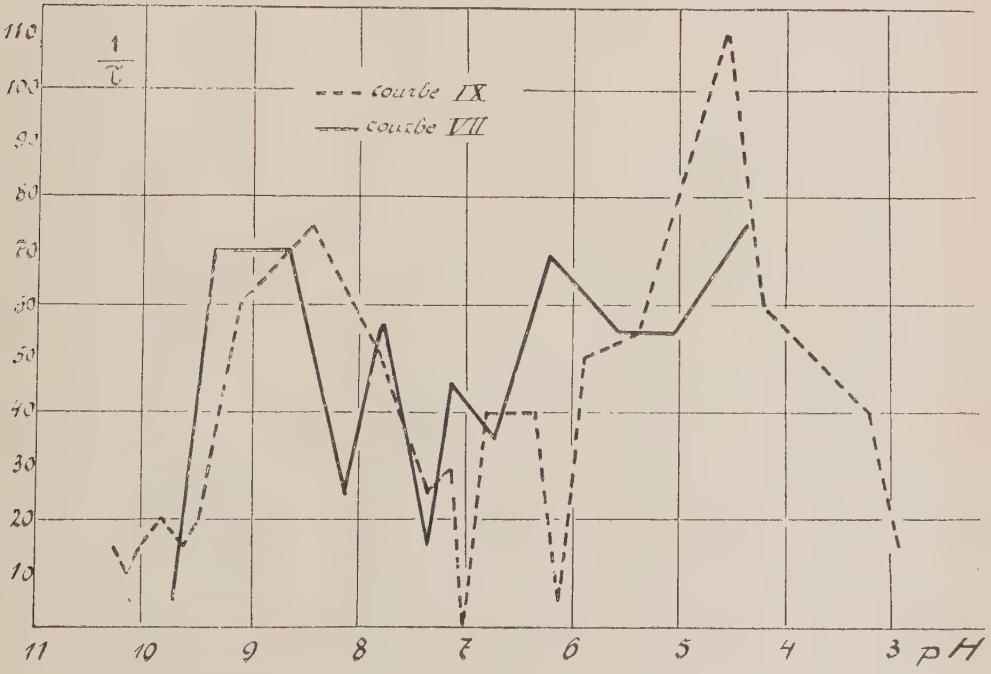
II) *La comparaison de l'extraction* Javillier et de *l'extraction directe sur la farine.* (Courbes IX et X)

Les points isoélectriques de ces deux courbes ne coïncident pas. Il se pourrait qu'il y ait un glissement de 1 unité pH des points isoélectriques (graphique 7).

Graphique 7



Graphique 8



III) *La comparaison de la gluténine* JAVILLIER *et de la protéine inconnue de* JAVILLIER.

(Courbes VII et IX.)

On constate que ces deux protéines ont des points isoélectriques différents. Par conséquent ces résultats confirment l'opinion de JAVILLIER qui prétend isoler une nouvelle protéine par l'extraction avec l'alcool potassé. (Graphique 8.)

IV. *La comparaison entre la gluténine extraite du gluten et de la gluténine de* JAVILLIER.

(Courbes VI et VII.)

On constate l'apparition d'un point isoélectrique nouveau à pH = 7,07; mais les points isoélectriques voisins de 6 sont conservés. (Graphique 5.)

RESUME DES RESULTATS OBTENUS.

Comme nous avons déjà pu le voir les résultats varient avec les modes d'extraction, les tampons employés etc.

L'emploi de l'alcool potassé semble scinder la molécule de la protéine, ce qui explique le grand nombre de pK obtenus dans les courbes représentant l'extraction par l'alcool potassé.

4° ETUDE GRAPHIQUE DES ALBUMINES ET GLOBULINES.

Pour extraire les albumines et globulines nous avons opéré d'après JAVILLIER, car cette extraction demande relativement peu de temps et nous avons constaté que les résultats sont les mêmes que si on opère d'après la méthode officielle.

Nous avons comparé deux farines, l'une ordinaire et l'autre une farine pure de Manitoba.

Le point isoélectrique des albumines est voisin de 4,6 d'après différents auteurs. D'après ERRERA le point iso. des albumines se trouve entre pH 5 et 6, celui des globulines entre pH 3 et 4.

I. *Farine ordinaire délipidée.*

L'extraction a donné 350 mg d'azote.

Le pH initial de la solution = 6,55.

Solution titrée par HCl N/10.

TABLEAU XIII.

E mv.	pH	Δ pH	pH moyen
280	6,55	60	6,25
246	5,95	70	5,60
212	5,25	30	4,90
177	4,55	65	4,22
145	3,90	30	3,75
130	3,60	35	3,42
113	3,25	20	3,15
102	3,05	15	2,97
95	2,90	40	2,70
90	2,50	4	2,48
86	2,46		

Voir graphique 9, courbe XI.

On observe une floculation au pH 5,25.

a) pK_1 = 2,97
pK_2 = 3,75

6,72

point iso. app. = **3,36**

b) pK_2 = 3,75
pK_3 = 4,90

8,65

point iso. app. = 4,32

II. *Farine pure de Manitoba délipidée.*

Le pH initial de la solution = 6.

Solution titrée par ClH N/10.

TABLEAU XIV.

E mv.	pH	Δ pH	pH moyen
242	5,70	25	5,50
229	5,45	58	5,15
199	4,87	52	4,60
175	4,35	43	4,10
155	3,92	42	3,70
134	3,50	20	3,40
124	3,30	25	3,17
112	3,05	15	2,97
106	2,90	10	2,85
100	2,80	10	2,75
96	2,70	15	2,62
90	2,55		

a) pK_1 = 2,75
pK_2 = 3,17

5,92

point iso. app. = 2,96

b) pK_2 = 3,17
pK_3 = 5,50

8,67

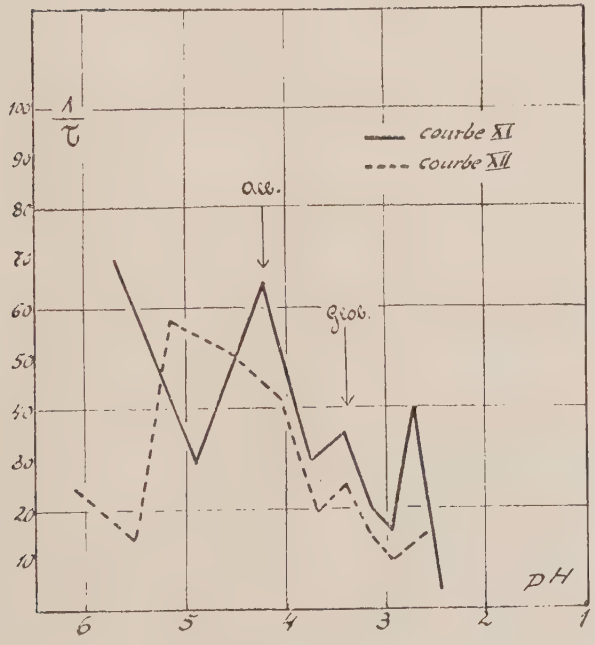
point iso. app. = 4,33

TABLEAU XV.

Tableau comparatif des points isoélectriques des albumines et globulines extraites d'une farine ordinaire et d'une farine pure de Manitoba.

Les deux farines avaient été délipidées auparavant. Le taux en azote trouvé pour la farine ordinaire a été de 350 mg, celui de la farine de Manitoba de 370 mg.

Farine ordinaire	Farine de Manitoba
points iso. calculés	
a) 3,36	a) 2,96
b) 4,32	b) 4,33



Graphique 9

COMPARAISON DES COURBES ET RESULTATS.

En comparant les deux courbes XI et XII (graphique 9), tirées des tableaux XIII et XIV nous constatons que l'allure générale des deux courbes est la même.

Pour la farine ordinaire nous trouvons deux points iso. (4,32 et 3,36). Pour la farine de Manitoba nous trouvons également deux points iso. (4,33 et 2,96). On voit qu'aux erreurs d'expérience près les points iso. apparents des deux farines coïncident. Comme nous savons d'après les résultats d'autres auteurs que le point iso. de l'albumine est voisin de 4,6 nous pourrons attribuer à l'albumine les points iso. 4,32 et 4,33 trouvés par notre méthode. Les points iso. 2,96 et 3,36 pourront être attribués à la globuline.

CONCLUSIONS GENERALES.

L'étude électrométrique des protéines de la farine nous a permis de différencier les diverses protéines par leurs *points iso-électriques apparents.*

Nous résumons dans un tableau les résultats obtenus en les comparant aux résultats donnés par les auteurs étrangers.

I. *Gliadine.*

Tague	Autres auteurs	Par notre méthode électrométrique
6,5	6,4—6,5	6,52 (Gliadine extraite du gluten) moyenne calculée, voir page 74.
		9,13 (Gliadine gluten, sol. alcaline)
		5,38 / 9,08 (Gliadine extraite directement de la farine)
		6,10 (Gliadine Javillier, sol. acide)
		5,33 / 8,62 (Gliadine Javillier, sol. alcaline)

II. *Gluténine.*

Tague	Autres auteurs	Par notre méthode électrométrique
6,8	5,1—5,4 4,5—4,8	5,92 / 9,03 (Gluténine gluten, solution alcaline)
		5,87 / 7,07 / 7,79 (Gluténine Javillier, solution alcaline)

III. *Albumine.*

Errera	Autres auteurs	Par notre méthode électrométrique
5 - 6	4,6	4,32 (farine ordinaire) 4,33 (farine de Manitoba)

IV. *Globuline.*

Errera	Autres auteurs	Par notre méthode électrométrique
3 - 4		3,36 (farine ordinaire) 2,96 (farine de Manitoba)

V. *Protéine* JAVILLIER.

La protéine JAVILLIER extraite par l'alcool potassé n'a pas encore été étudiée par d'autres auteurs. Son point isoélectrique n'est donc pas connu.

Points iso. app. trouvés par notre méthode :
5,03 8,08 9,80 (extraction alcool potassé, méthode Javillier, solution acide)
6,58 8,33 9,91 (extraction méthode Javillier, alcool potassé, sol. alcaline)
5,66 9,09 (extraction alcool potassé sur farine directement, sol. alcaline)

Le but que nous nous étions proposé d'étudier a été atteint. La méthode électrométrique permet de distinguer et de classer les protéines. Cette méthode a l'avantage d'être très commode, rapide et exacte.

Pour la gliadine nous trouvons des points iso. apparents voisins de ceux déterminés par TAGUE et d'autres auteurs. (6,5 et 6,4).

Ex.: 6,55 (gliadine extraite à partir du gluten).
6,1 (gliadine extraite d'après JAVILLIER).

Pour la gluténine nous trouvons des points iso. apparents voisins de 7 comme celui de TAGUE (6,8), voisins de 5 comme ceux des autres auteurs (5,1-5,4).

Quant aux points iso. apparents de l'albumine et de la globuline nos résultats sont très satisfaisants. En effet, le point iso. apparent que nous avons trouvé pour l'albumine se situe entre 4,32 et 4,33 (4,6 résultat des autres auteurs). Il diffère un peu de celui que donne ERRERA (5-6).

Le point iso. apparent trouvé pour la globuline se situe entre 2,96 et 3,30 d'après notre méthode (3-4 d'après ERRERA).

Notre méthode est avantageuse en ce sens qu'elle permet de définir des points iso. apparents nouveaux.

Ex.: La gliadine d'après notre méthode a deux points iso. apparents. l'un voisin de 6,5 (6,52 et 6,10), l'autre voisin de 9 (9,08, 9,13 et 8,62).

Ce dernier point iso. apparent (voisin de 9) n'existe que pour la gliadine en solution alcaline.

Pour la gluténine notre méthode nous donne deux points iso. apparents nouveaux, l'un voisin de 6. (5,92, 5,87), l'autre voisin de 9 (9,03).

La globuline et l'albumine n'ont chacune qu'un seul point iso. apparent, ce qui concorde avec les résultats trouvés par d'autres auteurs.

D'autre part nous avons mis en évidence l'existence de la protéine JAVILLIER qui présente 3 points iso. apparents.

Le premier entre 5 et 5,5.

Le deuxième entre 8 et 8,3.

Le troisième entre 9 et 9,8.

Commentaires:

Notre méthode exige une extraction rapide et un bon choix des réactifs employés. Elle reste forcément un peu imprécise, car nous ne traçons les courbes que par points.

Un tracé continu serait évidemment plus utile. On aurait une meilleure détermination de τ, la place des maxima et minima serait plus régulière d'une courbe à l'autre.

Néanmoins nous avons prouvé que la méthode électrométrique est applicable à l'étude qualitative des protéines de la farine et qu'elle peut être employée pour toute autre protéine. On pourra même l'appliquer à une étude quantitative des protéines.

Principaux ouvrages consultés.

1. LIQUIER. — Annales de chimie et de physique t. VIII, p. 120.
2. ABDERHALDEN. — Biochem. Handlexikon (Chap. des protéines), Band 4.
3. KÖNIG. — Chemie der Menschlichen..., III. Band 2. Teil, p. 504.
4. ALAKRINSKAJA. — Zur Frage der Bildung des Weizenmehlklebers als eines kolloïd-chemischen Komplexes. Das Mühlenlaboratorium, V., 1935, p. 9—10.
5. BAILEY (V. H.). — Chemistry of wheat flour. (Chemical catalog New-York, 1925).
6. BALLAND (A.). — Recherches sur les blés, farines et le pain. (Lavauzelle, Paris 1894).
7. BULLETIN DE LA SOCIETE CHIMIQUE DE FRANCE. Avril 1934. *Guéron*, p. 425. Août 1934, *Bonot*, p. 1023.
8. BOUTROUX. — Comptes rendus de l'Académie des Sciences, 1893, t. 120, p. 924.
9. BRUERE. — Remarques sur le blé et les farines. (Journal phys. et chim., juillet 1931, t. XIV, p. 5).
10. COHNHEIM. — Chemie der Eiweisskörper 1900.
11. COOK and ALBBERG. — Preparation of glutenin in urea solutions. (Canadian Journ. of Research, V., 1931, p. 355—374).
12. COOK (W. H.). — Preparation and heat denaturation of the gluten proteins. (Ibid V., 1931, p. 389—406).
13. DENIGES. — Précis de chimie analytique, p. 854.
14. FLEURENT. — Sur la relation qui existe entre la proportion de gluten contenue dans les différents blés et la proportion des matières azotées. Compte rendu de l'Académie des Sciences, 28 déc. 1903. (Bulletin de la Société chimique de France, 3e Série, tome 33, 1904, p. 81).

15. FLEURENT (E.). — Le pain de froment. (Paris 1911).
16. GEX. — Annales de physique biologique. (Description de l'électrode d'antimoine, 1.)
17. GIRARD AIME. — Recherches sur la composition des blés et sur leur analyse. Compte rendu de l'Acamie des Sciences, tome 124, p. 876 et 926.
18. JAVILLIER et DELATIDES. — Bulletin de la Société de chimie biologique, nov. 1934, p. 1542.
19. JOURNAL DE CHIMIE PHYSIQUE ET REVUE GENERALE DES COLLOIDES. 1931 (p. 670 à 760 et 124 à 130).
20. JOURNAL DE CHIMIE PHYSIQUE ET REVUE GENERALE DES COLLOIDES, 1931, caractères généraux des protéides.
21. KENT JONES. — Modern cereal chemistry. (The Norher Publishing Co., Liverpool 1927).
22. KESTNER OTTO. — Chemie der Eiweisskörper. (Braunschweig 1925).
23. KOSMIN (Nathalie) und POPZOWA (Antonina). — Gliadin-Glutenin-Verhältnis im Kleber verschiedener Qualität. (Das Mühlenlaboratorium, IV, 1934, p. 153—158).
24. LEGENDRE. — Les céréales, 1935.
25. LOEB (J.). — Les protéines. (Paris 1929).
26. MAURICIO. — Die Nahrungsmittel aus Getreide. (Berlin 1924).
27. NEUMANN. — Brotgetreide und Brot. (Berlin 1923, p. 33, p. 195).
28. OSBORNE. — The vegetable proteins. (London 1912).
29. OSBORNE and KAMPBELL. — Journal of the americ. chem. Soc., 22, p. 379—413.
30. OSBORNE and HARRIS. — Journal of the americ. chem. Soc., 18, p. 575—582.
31. OSBORNE and VORHEES. — Americ. chem. Journal of phys., 17, p. 231—265 (1904).
32. PAULI. — Kolloidchemie der Eiweisskörper. (Leipzig 1920).
33. — Naturwissenschaft 1932 (p. 28—36).
34. RESNITSCHENKO (Michael S.). — Mühlenlaboratorium V., 1935 (p. 9 et 10).
35. RIDEAL E. K. — Ueber Einmolekülschichten von Proteinen. (Kolloid-Zeitschrift, LXI, 1932, p. 218—222).

36. RITTHAUSEN. — Journal für prakt. Chemie 23, (p. 481—486).
37. SCHELL. — Société de chimie biologique 1934. Rapport fait sur dosage d'azote total.
38. STROHL. — Leçons de physico-chimie 1927, (page 83 et 128).
39. Tables annuelles de constantes, (Vol. IX, 1931, p. 1427).
40. TAGUE. — Journal of americ. chem. Soc. 1925 (vol. 47, page 418).
41. WATTIEZ et STERNON. — Traité de chimie végétale. (1935, p. 595.)
42. VLES. — Précis de chimie physique.

TABLE DES MATIERES

Avant-Propos 11

Introduction 15

Composition chimique générale du grain de céréales 15

1° Eau 16

2° Eléments chimiques 16

3° Matières minérales 16

4° Lipides 16

5° Glucides 17

6° Protides (étude détaillée) 17

Chapitre I. 31

Méthode de dosage de l'azote total 31

Principes de la méthode 31

Description de la méthode donnée par Schell et Guillemet 33

Chapitre II. 37

1° Méthode de mesure du pH 37

2° Technique de la mesure du pH 39

3° Effet tampon 43

Chapitre III. 51

Extraction des protéines 51

1° Préliminaires 51

2° Extraction des principales protéines par la méthode classique 54

3° Extraction des protéines par la méthode de Javillier 58

4° Extraction directe à partir de la farine .. 63

Chapitre IV. 65

Analyse des graphiques 65

1° Etude graphique de la gliadine 65

2° Etude graphique de la gluténine 76

3° Etude graphique de la protéine Javillier .. 79

4° Etude graphique des albumines et globulines 86

Conclusions générales 91

Vu:

Strasbourg, le 9 Juin 1936

Le Président du Jury:

CH. LAPP.

Vu et approuvé:

Strasbourg, le 10 Juin 1936

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie:

A. SARTORY.

Vu et permis d'imprimer:

Strasbourg, le 13 Juin 1936

Le Recteur de l'Académie,

Président du Conseil de l'Université:

J. DRESCH.